

Untersuchungen zur Regulation des humanen Replikationsfaktors Cdc45

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

vorgelegt dem
Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Diplom-Biochemikerin Sibyll Pollok
geboren am 06.05.1976 in Weimar/Thüringen

Gutachter:

1. Prof. F. Große
2. PD Dr. P. Hemmerich
3. Prof. U. Hübscher

Tag des Rigorosums: 19. Juni 2007

Tag der öffentlichen Verteidigung: 24. Juli 2007

Das Leben besteht nicht nur in der Hauptsache aus Taten und Geschehnissen.
Es besteht im Wesentlichen aus dem Sturm der Gedanken, der jedem durch
den Kopf tobt.

Mark Twain

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Der eukaryotische Zellzyklus	1
1.1.1 Die Regulation des Zellzyklus durch Cyclin-Cdk-Komplexe und CKIs	2
1.1.2 Die transkriptionelle Regulation des G ₁ -/S-Übergangs durch E2F und Myc	4
1.2 Die eukaryotische DNA-Replikation	5
1.2.1 Assemblierung des prä-replikativen Komplexes	6
1.2.2 Initiation der DNA-Replikation	7
1.2.3 DNA-Neusynthese durch Polymerasen	9
1.3 Der Replikationsfaktor Cdc45	10
1.3.1 Entdeckung und chromosomale Lokalisation des Cdc45	10
1.3.2 Motive im CDC45-Gen bzw. in der Cdc45-Aminosäuresequenz	11
1.3.3 Cdc45-Spleißvarianten	11
1.3.4 Änderung des Cdc45-mRNA- bzw. -Proteingehaltes	12
1.3.5 Cdc45-Expression in embryonalen und adulten Geweben	12
1.3.6 Subzelluläre Lokalisation des Cdc45-Proteins	12
1.3.7 Mutanten / Depletion / <i>knock-down</i> / <i>knock-out</i> / Mikrodeletion des Cdc45	12
1.3.8 Regulation der Cdc45-Chromatinassoziation	13
1.3.9 Interaktionspartner und putative molekulare Funktionen des Cdc45	15
1.4 Wege für Zellen, den mitotischen Zellteilungszyklus zu verlassen	16
1.4.1 Übergang der Zellen in die G ₀ -Phase	17
1.4.2 Übergang der Zellen in die Seneszenz	17
1.4.3 Übergang der Zellen in die terminale Differenzierung	18
1.4.4 Übergang der Zellen in die Apoptose	18
1.5 Proliferationsmarker in der Tumorphathologie	18
1.6 Zielstellung	20
 2 Material und Methoden	 21
2.1 Zelllinien	21
2.2 Kultivierung und Ernte der Zellen	21
2.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	22
2.4 Synchronisation von Zellen	23
2.4.1 Synchronisation am Übergang G ₁ -/S-Phase	23
2.4.2 Synchronisation in der G ₀ -Phase	24
2.5 Induktion und Nachweis der Seneszenz	24
2.6 Induktion und Nachweis der terminalen Differenzierung	25
2.7 Inhibition der lysosomalen und proteasomalen Proteindegradation	25
2.8 Apoptoseinduktion	25
2.9 Bestimmung der Protein-Halbwertszeit	26
2.9.1 Cycloheximid-Inkubation	26
2.9.2 Metabolische Markierung mit [³⁵ S]-Methionin und [³⁵ S]-Cystein	26
2.10 Expression und Reinigung von rekombinantem Cdc45	27
2.11 Durchflusszytometrische Analyse	28
2.12 Immunfluoreszenzmikroskopie	28
2.12.1 Aufbringen der Zellen auf Objektträger und BrdU-Markierung	28
2.12.2 Fixierung und Permeabilisierung	29
2.12.3 DNA-Denaturierung	29
2.12.4 Immundetektion durch indirekte Immunfluoreszenz	29
2.13 Präparation von Ganzzellextrakten	30
2.14 Präparation von fraktionierten Zellextrakten	30

2.15 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	31
2.16 Immunpräzipitation	31
2.17 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	32
2.18 Kolloidale Coomassie-Färbung	32
2.19 Western-Blot und Immundetektion	32
2.20 Immunhistochemie	34
2.21 Antikörper	34
2.22 Lösungen und Puffer	36
2.23 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	36
2.24 Geräte	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Regulation des humanen Cdc45-Proteins in proliferierenden Zellen	38
3.2 Regulation des humanen Cdc45-Proteins in Zellen, die den mitotischen Zyklus verlassen haben	41
3.2.1 Humanes Cdc45 in quieszenten Zellen	41
3.2.2 Bestimmung des Zeitpunktes der Neusynthese des Cdc45-Proteins	44
3.2.3 Humanes Cdc45 in seneszenten Zellen	46
3.2.4 Humanes Cdc45 in terminal differenzierten Zellen	49
3.2.5 Stabilisierung des Cdc45-Proteins durch proteasomale Inhibitoren	52
3.2.6 Humanes Cdc45 in apoptotischen Zellen	53
3.3 Ermittlung der Halbwertszeit des humanen Cdc45-Proteins	56
3.4 Bestimmung der Cdc45-Molekülzahl in humanen Zellen	57
3.5 Expression des Cdc45-Proteins in humanen Primär- und Tumorzelllinien	59
3.6 Immunhistochemischer Nachweis des Cdc45-Proteins in humanen Geweben	60
4 Diskussion	64
4.1 Cdc45 ist ein proliferationsassoziiertes Antigen	64
4.2 Transkriptionelles <i>silencing</i> E2F-regulierter Gene	67
4.3 Abbau des Cdc45-Proteins über den Ubiquitin-Proteasom-Weg	69
4.4 Keine Spaltung des humanen Cdc45-Proteins im Zuge der Apoptose	72
4.5 Halbwertszeit und Molekülzahl des humanen Cdc45-Proteins	73
4.6 Cdc45 als neuer Proliferationsmarker in der Tumorpathologie	75
4.7 Ausblick	79
5 Zusammenfassung	81
6 Literaturverzeichnis	82
Abkürzungsverzeichnis	I
Selbständigkeitserklärung	III
Lebenslauf	IV
Danksagung	V

1 Einleitung

Zur Wahrung der genomischen Integrität einer Zelle ist die akkurate Verdopplung der Erbinformation im Zuge der Zellzyklusprogression essentiell. Umfangreiche Studien der vergangenen Jahre, die vor allem in Hefen durchgeführt wurden, erweiterten entscheidend das Wissen um den DNA-Synthese-Prozess. Parallele Untersuchungen in Wirbeltieren zeigten viele Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede in Regulationsmöglichkeiten und beteiligten Replikationsfaktoren.

Die Aufklärung der DNA-Replikation in humanen Zellsystemen hilft in besonderem Maße, die Mechanismen der Krebsentstehung näher zu beleuchten. Charakteristisch für Krebszellen sind unter anderem Genmutationen und Amplifikationen von Genabschnitten. Amplifizierte Genabschnitte könnten durch mehrfache Initiation der DNA-Replikation während eines Zellzyklus entstanden sein (Shreeram & Blow, 2003). Ferner wurde berichtet, dass onkogene Viren die Replikationsproteine des humanen Wirtes für die Verdopplung ihres genetischen Materials rekrutieren (Dhar et al., 2001; Stedman et al., 2004). Das zunehmende Verständnis bezüglich der Regulation einzelner Replikationsfaktoren eröffnet zudem neue Diagnosemöglichkeiten. Seit einiger Zeit werden Replikationsproteine als Proliferationsmarker in der Tumorphathologie getestet (Abschnitte 3.6 und 4.6). Weiterhin wird diskutiert, ob Replikationsfaktoren mögliche molekulare Ziele für die Krebstherapie darstellen könnten (Feng et al., 2003; Lei, 2005; Shreeram & Blow, 2003).

1.1 Der eukaryotische Zellzyklus

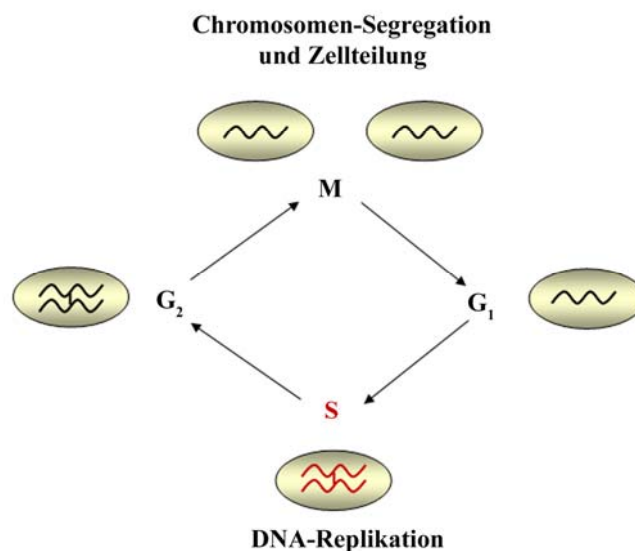


Abbildung 1: Der eukaryotische Zellzyklus

Der Zellzyklus wird traditionell in vier distinkte Phasen untergliedert (Howard & Pelc, 1953). Die G₁-, S- und G₂-Phase gehören zur Interphase, in der die Zelle Vorbereitungen für die M-Phase trifft. In der Mitose wird dann das verdoppelte genetische Material auf die neu entstehenden Tochterzellen verteilt.

Für die normale zelluläre Proliferation ist der geordnete Ablauf des Zellzyklus von eminenter Bedeutung (Abbildung 1). So darf die chromosomale DNA nur einmal je Zellzyklus durch den Prozess der DNA-Replikation in der Synthese-Phase (S-Phase) verdoppelt werden. Das kopierte

Erbmaterial muss später ohne Fehler und in gleichen Teilen an die neu entstehenden Tochterzellen in der Mitose-Phase (M-Phase) weitergegeben werden. S- und M-Phase werden durch zwei so genannte *gap*-Phasen (G-Phasen) voneinander getrennt. Die vor der Synthese gelegene Phase wird als G_1 und die vor der Mitose als G_2 bezeichnet. Verschiedene Kontrollpunkte sichern die korrekte und unumkehrbare Abfolge des Zyklus, um die Stabilität des Genoms zu garantieren (Lukas et al., 2004; Sancar et al., 2004).

1.1.1 Die Regulation des Zellzyklus durch Cyclin-Cdk-Komplexe und CKIs

Wichtige Regulatoren der Zellzyklusprogression in Eukaryoten sind *cyclin dependent kinases* (Cdks), die zu definierten Zeiten im Zellzyklus durch Bindung der korrespondierenden Cycline aktiviert werden (Hunter & Pines, 1994; Morgan, 1995; Pines, 1995). Bedeutsame Cyclin-Cdk-Komplexe der Säuger sind in **Abbildung 2A** mit ihrer zellzyklusspezifischen Funktion dargestellt. Cdks zählen zu den Serin/Threonin-Kinasen, deren Proteinmenge im Zellzyklus relativ konstant bleibt (Vermeulen et al., 2003). Die Cycline besitzen eine gewisse Sequenzhomologie innerhalb der *cyclin box*, welche für die Bindung und Aktivierung des Cdk-Partners wichtig ist (Kobayashi et al., 1992; Lees & Harlow, 1993).

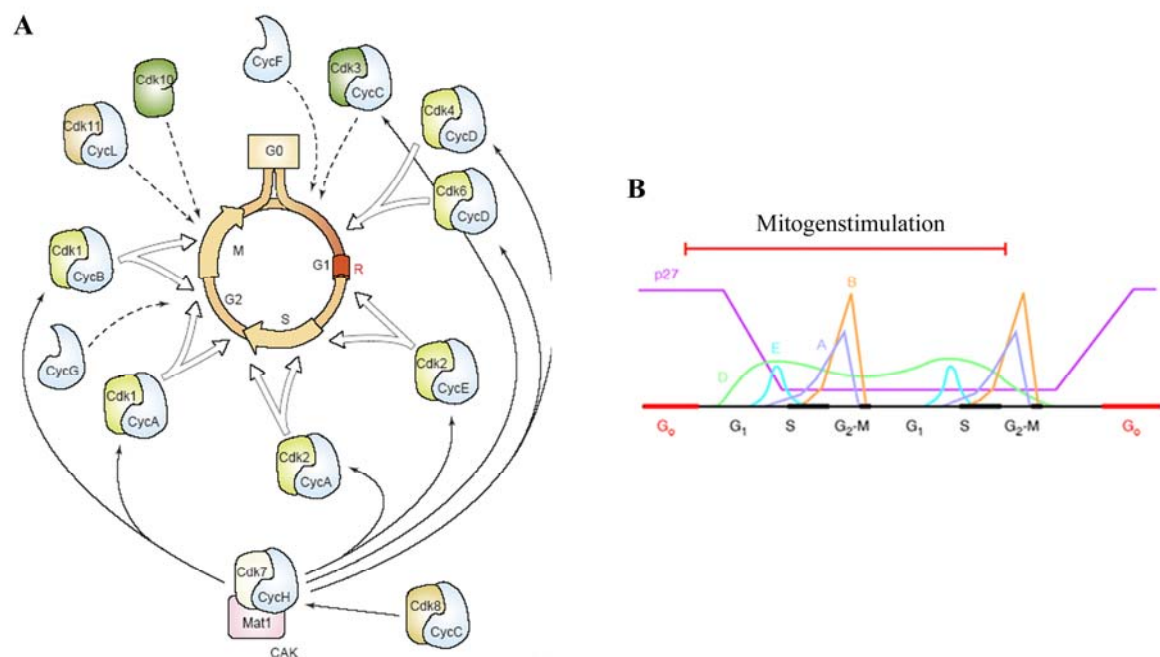


Abbildung 2: Zellzyklusspezifische Funktion der Cyclin-Cdk-Komplexe und Expression der Cycline

- A Heterodimere Cyclin-Cdk-Komplexe und ihre zellzyklusrelevante Funktion in Säugerzellen. Darstellung entnommen aus (Malumbres & Barbacid, 2005).
- B Übersicht über die charakteristisch oszillierende Cyclin-Menge während des Zellzyklus. Darstellung modifiziert nach (Sherr, 1996).

Die katalytische Aktivität der Cdks wird durch verschiedene Mechanismen reguliert (Morgan, 1997; Tyers & Jorgensen, 2000): (a) zellzyklusspezifische Expression und Degradation der Cycline, (b) zellzyklusspezifische Modulation der subzellulären Lokalisation der Cycline, (c) Bindung des Cyclins an den korrespondierenden Cdk-Partner, (d) inhibitorische oder aktivierende Phosphorylierungen und (e) Bindung von Inhibitoren. Auf zwei dieser Regulationsmöglichkeiten soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

Die Cyclin-Menge oszilliert charakteristisch während des Zellzyklus (Abbildung 2B) durch regulierte Neusynthese und gezielte Proteolyse (Ekholm & Reed, 2000; Hunter & Pines, 1994; Sherr, 1994a).

D-Typ Cycline werden in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren in der frühen G₁-Phase synthetisiert und daher auch als Wachstumsfaktorsensoren bezeichnet (Sherr, 1993; Won et al., 1992). Die Aktivität von Cyclin D-Cdk4 und/oder Cyclin D-Cdk6 wird für die Passage des Restriktionspunktes in der späten G₁-Phase benötigt (Sherr, 1995) (Abbildung 3). Die Cyclin E-Expression beginnt in der G₁-Phase (Koff et al., 1991). Der aktivierte Cyclin E-Cdk2-Komplex ist ebenfalls maßgeblich an der Überschreitung des Restriktionspunktes beteiligt (Ohtsubo & Roberts, 1993; Ohtsubo et al., 1995) (Abbildung 3). A-Typ Cycline werden während der G₁/S-Transition exprimiert (Henglein et al., 1994). Auf die Rolle von Cyclin E-Cdk2 und Cyclin A-Cdk2 in der DNA-Replikation wird in Abschnitt 1.2.2 genauer eingegangen. Darüber hinaus ist der Cyclin A-Cdk1-Komplex für das Durchlaufen der G₂-Phase notwendig (Girard et al., 1991; Pagano et al., 1992). Die Synthese der B-Typ Cycline beginnt während der S-Phase und der aktivierte Cyclin B-Cdk1-Komplex wird als wichtigster Regulator der Mitose angesehen (Nurse, 1994).

Der Abbau der Cycline erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System (Morgan, 1997). Die Cycline D und E sind kurzlebige Proteine mit einer Halbwertszeit von ungefähr 20-30 Minuten (Diehl et al., 1997; Ohtsubo et al., 1995; Russell et al., 1999; Welcker et al., 1996; Won & Reed, 1996). In der carboxyterminalen Region der D-Cycline wurde ein PEST-Motiv identifiziert (P = Prolin, E = Glutaminsäure, S = Serin, T = Threonin), welches charakteristisch für schnell degradierte Proteine ist (Rechsteiner & Rogers, 1996; Rogers et al., 1986). Die Cycline A und B besitzen eine aminoterminalen *destruction*-Box (D-Box), welche für den proteasomalen Abbau notwendig ist (Glutzer et al., 1991; Morgan, 1997). In der Prometaphase wird beispielsweise Cyclin B vermittelt durch den *anaphase promoting complex/cyclosome* (APC/C) degradiert und ist damit in der G₁-Phase abwesend (Brandeis & Hunt, 1996; Clute & Pines, 1999).

Eine weitere Regulationsebene der Cdk-Aktivität ist die Interaktion mit *cyclin dependent kinase inhibitors* (CKIs). Säugetier-CKIs lassen sich in zwei Familien einteilen: die CIP/KIP- und die INK4-Familie (Carnero & Hannon, 1998; Hengst & Reed, 1998; Sherr & Roberts, 1995).

p21^{CIP1} (el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993), p27^{KIP1} (Polyak et al., 1994; Toyoshima & Hunter, 1994) und p57^{KIP2} (Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995) als Mitglieder der *Cdk inhibitory protein/kinase inhibitory protein*-Familie (CIP/KIP) inhibieren ein breites Spektrum von Cyclin-Cdk-Komplexen (Hunter & Pines, 1994). p21^{CIP1} und p27^{KIP1} werden als negative Regulatoren der Zellproliferation angesehen (Abschnitte 3.2.1 bis 3.2.4). Russo und Mitarbeiter klärten röntgenkristallographisch die dreidimensionale Struktur eines ternären Komplexes aus p27^{KIP1}-Inhibitor-domäne, Cdk2 und des carboxyterminalen Bereiches des Cyclin A auf (Russo et al., 1996). Daraus wurde folgender Mechanismus der Inhibition abgeleitet: Der aminoterminal Bereich der p27^{KIP1}-Inhibitor-domäne bindet an die konservierte *cyclin box* des Cyclin A. Der carboxyterminale Bereich der Inhibitor-domäne des p27^{KIP1} interagiert anschließend mit der aminoterminalen Domäne der Cdk2, wodurch eine Konformationsänderung der Letzteren induziert wird. Darüber hinaus wird die ATP-Bindestelle der Cdk2 blockiert, da p27^{KIP1} in das aktive Zentrum ragt. Aufgrund der Sequenzhomologie der Inhibitor-domänen für p21^{CIP1} und

p57^{KIP2} wird eine analoge Hemmung ihrer korrespondierenden Cyclin-Cdk-Komplexe vermutet (Ekholm & Reed, 2000).

Zur *inhibitor of cdk 4*-Familie (INK4) zählen in Säugern vier Mitglieder: p16^{INK4A} (Serrano et al., 1993), p15^{INK4B} (Hannon & Beach, 1994), p18^{INK4C} (Guan et al., 1994; Hirai et al., 1995) und p19^{INK4D} (Chan et al., 1995; Hirai et al., 1995). Diese CKIs binden spezifisch Cdk4 oder Cdk6 (De Clercq & Inze, 2006; Morgan, 1995). Auf die Funktion von p16^{INK4A} in seneszenten Zellen wird ausführlich in Abschnitt 3.2.3 eingegangen.

1.1.2 Die transkriptionelle Regulation des G₁-/S-Übergangs durch E2F und Myc

Neben den Cyclin-Cdk-Komplexen reguliert auch der pRb/E2F-Signalweg den Übergang der Zellen in die S-Phase (Dyson, 1998; Ohtani, 1999; Stevaux & Dyson, 2002; Trimarchi & Lees, 2002). In Säugern wurden acht E2F-Familienmitglieder identifiziert: E2F1-3 wirken als Transaktivatoren, während E2F4-8 als Repressoren der entsprechenden Zielgene fungieren (Rowland & Bernards, 2006; Stevaux & Dyson, 2002; Trimarchi & Lees, 2002). Die E2F-Untereinheiten sind homolog hinsichtlich ihrer aminoterminalen DNA-Bindedomäne, der zentralen Dimerisierungsdomäne und der carboxyterminalen Domäne, die eine Bindestelle für Pocketproteine besitzt.

Mitglieder der Pocketproteinfamilie, zu denen das *protein of retinoblastoma gene* (pRb), p107 und p130 gehören, interagieren als transkriptionelle Co-Repressoren mit E2F/DP-Heterodimeren (Mulligan & Jacks, 1998). So assoziiert E2F1-3 präferentiell mit pRb während der G₁-Phase (Takahashi et al., 2000; Wells et al., 2000).

Gen mit E2F-Motiv im Promotorbereich	Funktion des Genprodukts	Referenzen
E2F1	G ₁ -/S-Transition	(Neuman et al., 1994; Smith et al., 1996)
Myc	G ₁ -/S-Transition	(Hiebert et al., 1989; Thalmeier et al., 1989)
Cyclin E, Cyclin A	G ₁ -/S-Transition DNA-Replikation	(Botz et al., 1996; DeGregori et al., 1995)
Dihydrofolat-Reduktase	Nukleotid-Synthese	(DeGregori et al., 1995; Slansky et al., 1993)
Thymin-Kinase	Nukleotid-Synthese	(Karlseder et al., 1996)
Orc1	DNA-Replikation	(Asano & Wharton, 1999; Ohtani et al., 1996)
Cdc6	DNA-Replikation	(Hateboer et al., 1998; Leone et al., 1998; Ohtani et al., 1998; Yan et al., 1998)
Cdt1	DNA-Replikation	(Karakaidos et al., 2004; Yoshida & Inoue, 2004b)
Geminin	DNA-Replikation	(Markey et al., 2004; Xouri et al., 2004; Yoshida & Inoue, 2004b)
Mcm3, Mcm4, Mcm5, Mcm6, Mcm7	DNA-Replikation	(DeGregori et al., 1995; Duronio et al., 1998; Kel et al., 2001; Leone et al., 1998; Ohtani et al., 1999; Suzuki et al., 1998)
Mcm10	DNA-Replikation	(Yoshida & Inoue, 2004a)
Cdc45	DNA-Replikation	(Arata et al., 2000; Loebel et al., 2000; Stevens et al., 2004)
DNA-Polymerase α	DNA-Replikation	(Pearson et al., 1991)
DNA-Polymerase ϵ	DNA-Replikation	(Huang et al., 2001)
PCNA	DNA-Replikation	(DeGregori et al., 1995; Huang & Prystowsky, 1996; Kel et al., 2001; Li et al., 2003b)

Tabelle 1: Gene mit Bindemotiven für Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie

In den Promotorbereichen von Zellzyklusregulatoren und einigen Replikationsfaktoren wurden Bindesequenzen für Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie identifiziert.

Die pRb-E2F-Interaktion ist reversibel und wird durch den pRb-Phosphorylierungsstatus reguliert (Kaelin, 1999; Tamrakar et al., 2000). In der frühen G₁-Phase ist hypophosphoryliertes pRb an E2F gebunden und inhibiert die Expression von Genen, deren Produkte für den Eintritt in die S-

Phase notwendig sind. In [Tabelle 1](#) sind einige Gene aufgelistet, in deren Promotorbereichen E2F-Bindemotive identifiziert wurden ([Bracken et al., 2004](#); [Leone et al., 1998](#); [Ohtani, 1999](#)).

Für den Eintritt der Zelle in die S-Phase muss pRb phosphoryliert und damit funktionell inaktiviert werden ([Abbildung 3](#)). Diese Phosphorylierungen werden sukzessiv während der G₁-Phase durch Cyclin D-Cdk4/6 und Cyclin E-Cdk2 katalysiert ([Harbour et al., 1999](#); [Hatakeyama et al., 1994](#); [Lundberg & Weinberg, 1998](#)). Die initialen Phosphorylierungen des pRb erfolgen durch Cyclin D-Cdk4/6, wodurch die Expression von Cyclin E induziert wird. Über einen positiven Rückkopplungsmechanismus übernimmt nun der aktivierte Cyclin E-Cdk2-Komplex die weiteren pRb-Phosphorylierungen und ermöglicht das Überschreiten des Restriktionspunktes in der späten G₁-Phase ([Morgan, 1997](#)).

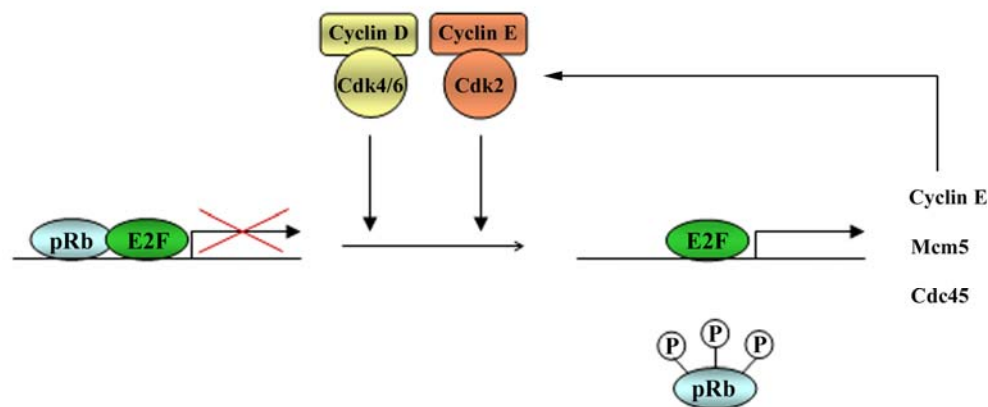


Abbildung 3: Der pRb/E2F-Signalweg reguliert den G₁-/S-Übergang

Für die G₁-/S-Transition einer Zelle muss pRb hyperphosphoryliert und damit inaktiviert werden. Der erste Phosphorylierungsschritt erfolgt durch Cyclin D-Cdk4/6 und der zweite durch Cyclin E-Cdk2. Phosphoryliertes pRb löst sich aus dem Komplex mit dem Transkriptionsfaktor E2F. E2F1-3 kann nun die Synthese von S-Phase-relevanten Genen vermitteln. Ein positiver Rückkopplungsmechanismus durch die E2F-gesteuerte Cyclin E-Expression ermöglicht die irreversible Zellzyklusprogression durch Überschreiten des Restriktionspunktes in der späten G₁-Phase.

Transkriptionsfaktoren der *myelocytomatosis* (Myc)-Familie regulieren parallel zu E2F die G₁-/S-Transition ([Aguda, 2001](#); [Amati et al., 1998](#)). Zu den Genen, die im Promotorbereich Bindesequenzen für Mitglieder der Myc-Familie haben, zählen E2F2 ([Sears et al., 1997](#)), Cyclin E ([Perez-Roger et al., 1997](#)), Cyclin D2 ([Coller et al., 2000](#)), Cdk4 ([Coller et al., 2000](#); [Hermeking et al., 2000](#)) und Cdc25A ([Galaktionov et al., 1996](#); [Grandori & Eisenman, 1997](#)). Es wird angenommen, dass Myc-Max-Dimere primär den Zellzyklus durch Aktivierung von Cyclin E-Cdk2-Komplexen vorantreiben ([Aguda, 2001](#); [Amati et al., 1998](#); [Obaya et al., 1999](#)).

1.2 Die eukaryotische DNA-Replikation

In den vergangenen Jahren wurde die eukaryotische DNA-Replikation intensiv in verschiedenen Modellorganismen erforscht. Dabei zeigte sich, dass die beteiligten Faktoren und die sequenziellen Abläufe hoch konserviert sind ([Bell & Dutta, 2002](#); [Bogan et al., 2000](#)). Die Identifizierung neuer Replikationsfaktoren und die genaue Aufklärung der einzelnen Prozesse verdeutlichten aber auch die Komplexität und die vielgestaltigen Regulationsebenen der Synthese-Phase.

1.2.1 Assemblierung des prä-replikativen Komplexes

Die DNA-Replikation in eukaryotischen Zellen muss strikt reguliert werden, um sicherzustellen, dass das komplette Genom einmal und nur einmal in jedem Zellzyklus dupliziert wird. Ein wichtiger Prozess ist die Bildung des so genannten prä-replikativen Komplexes (Bell & Dutta, 2002; Machida et al., 2005; Takeda & Dutta, 2005; Teer & Dutta, 2005). Hierbei assemblieren nacheinander in der späten Mitose- bzw. frühen G₁-Phase *origin recognition complex* (ORC), *cell division cycle 6* (Cdc6), *Cdc10 target 1* (Cdt1) und *minichromosome maintenance 2-7* (Mcm2-7) an den Startpunkten der Replikation, den *origins of replication* (Abbildung 4).

ORC setzt sich aus den sechs Untereinheiten *origin recognition complex 1-6* (Orc1-6) zusammen und bildet eine „Plattform“ für die Anbindung weiterer Proteine bzw. Proteinkomplexe (Bell, 2002; Chesnokov, 2007). In *Saccharomyces cerevisiae* ist ORC während des gesamten Zellzyklus mit Replikationsstartpunkten assoziiert (Diffley et al., 1994; Liang & Stillman, 1997). In *Xenopus*-Oozyten hingegen wird ORC nach Ausbildung des prä-replikativen Komplexes vom Chromatin ohne Beeinflussung der DNA-Replikation abgelöst (Sun et al., 2002). Resultate aus humanen Zellen zeigten auch, dass sich Orc1 während der S-Phase vom Chromatin löst und degradiert wird (Kreitz et al., 2001; Ohta et al., 2003). Mit diesem „ORC-Zyklus“ existiert in höheren Eukaryoten ein Mechanismus zur Verhinderung der Re-Replikation auf dem Niveau der *origin*-Erkennung (DePamphilis, 2003). ORC ist essentiell für die Assemblierung der Replikationsproteine Cdc6 und Cdt1 mit dem Chromatin (Bell & Dutta, 2002; Lei & Tye, 2001).

Cdc6 gehört wie einige ORC- und Mcm2-7-Untereinheiten zur AAA⁺-ATPase-Familie (Bell & Dutta, 2002). Ein weiterer Regulationsansatz zur Inhibierung von Re-Replikationsereignissen kann bei Cdc6 angesetzt werden. In Hefen wird Cdc6 phosphoryliert und proteolytisch degradiert (Drury et al., 1997; Perkins et al., 2001; Wolf et al., 1999). In Säugern folgt auf die Cdc6-Phosphorylierung in der S-Phase, der Export des Proteins aus dem Kern sowie die proteolytische Degradation (Jiang et al., 1999b; Petersen et al., 1999; Petersen et al., 2000; Saha et al., 1998a).

Cdt1 ist in Eukaryoten der wichtigste Angriffspunkt der Verhinderung einer wiederholten Replikationsinitiation. In der Bäckerhefe wird Cdt1 in der S-Phase aus dem Nukleus exportiert (Tanaka & Diffley, 2002). In Spalthefezellen wird Cdt1 exklusiv durch Proteolyse reguliert, währenddessen in Vertebraten zusätzlich zur zellzyklusspezifischen Degradation die Sequestrierung und Inaktivierung durch Geminin erfolgt (Maiorano et al., 2004; McGarry & Kirschner, 1998; Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000). Geminin verhindert die Cdt1-vermittelte Ladung des Mcm2-7-Komplexes in das Chromatin (Cook et al., 2004).

Mcm2 bis Mcm7 sind in Eukaryoten hochkonserviert und bilden den heterohexameren Mcm2-7-Komplex, welcher vermutlich die Rolle der DNA-Helikase im Replikationsprozess inne hat (Bell & Dutta, 2002; Forsburg, 2004; Tye, 1999). Die koordinierte Aktivität von ORC, Cdc6 und Cdt1 ist für das Laden des Mcm2-7-Komplexes essentiell (Cvetič & Walter, 2006; Randell et al., 2006). *In vitro* zeigte ein Mcm4,6,7-Subkomplex nur schwache Helikaseaktivität (Ishimi, 1997), aber an einer Replikationsgabel-ähnlichen Struktur konnte prozessive Helikaseaktivität gemessen werden (Lee & Hurwitz, 2001). In *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* wird Mcm2-7 mit Beginn der G₂-Phase aus dem Zellkern transportiert, was als weiterer Mechanismus zur Unterbindung der Re-Replikation in niederen Eukaryoten diskutiert wird (Bell & Dutta, 2002). In Metazoen sind Mcm2-7-Proteine in allen Zellzyklusphasen, mit Ausnahme der Mitose, nukleär

lokalisiert, aber nur in der S-Phase wurde die verstärkte Assoziation mit Chromatin beobachtet (Lei & Tye, 2001; Takeda & Dutta, 2005).

Mit Bindung des Mcm2-7-Komplexes an das Chromatin ist die Ausbildung des prä-replikativen Komplexes abgeschlossen. Es wird auch als *licensing* des Chromatins für eine neue Replikationsrunde bezeichnet.

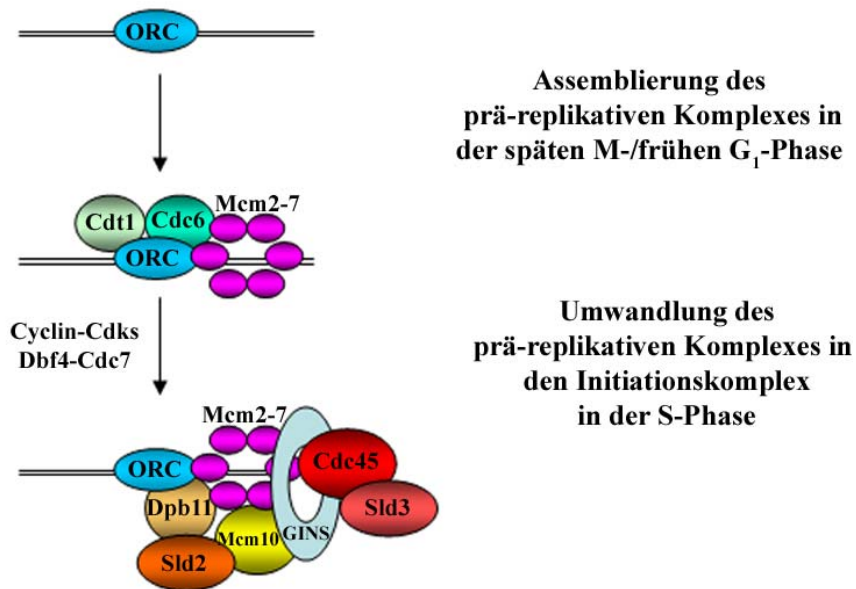


Abbildung 4: Initiation der DNA-Replikation an den *origins*

Das gezeigte Modell repräsentiert die umfangreichen Kenntnisse zur Initiation der chromosomalen DNA-Replikation aus *Saccharomyces cerevisiae*. An die Replikationsstartpunkte binden nacheinander in der späten M-/frühen G₁-Phase Cdc6, Cdt1 und der Mcm2-7-Komplex. Der assemblierte prä-replikative Komplex wird in der S-Phase durch die Aktivität der Kinasen Cdk2 und Cdc7 sowie nach Anbindung weiterer Replikationsfaktoren wie Dpb11, Sld2, Sld3, Mcm10, GINS und Cdc45 in den Initiationskomplex umgewandelt. Darstellung modifiziert nach (Kearsey & Cotterill, 2003).

1.2.2 Initiation der DNA-Replikation

Am G₁/S-Übergang wird der prä-replikative Komplex in den Initiationskomplex konvertiert und die DNA-Replikation initiiert, was auch als „Feuern“ der Replikationsursprünge bezeichnet wird (Abbildung 4). Dafür ist die Aktivität von mindestens zwei Kinasen notwendig (Bell & Dutta, 2002; Kelly & Brown, 2000; Woo & Poon, 2003). Die Kinasen Cyclin E/A-Cdk2 und *dumb bell former 4 - cell division cycle 7* (Dbf4-Cdc7) phosphorylieren verschiedene Replikationsproteine. Es wird davon ausgegangen, dass die Phosphorylierungen zum einen die Re-Replikation verhindern und zum anderen simultan die Ladung des Cdc45 (Abschnitt 1.3.9) und damit die Replikationsinitiation vermitteln.

In Säugern interagiert Cyclin A-Cdk2 mit Cdc6 und phosphoryliert diesen Replikationsfaktor (Coverley et al., 2000; Petersen et al., 1999; Saha et al., 1998a). Dadurch wird vermutlich freies Cdc6 degradiert und damit die Bildung von neuen prä-replikativen Komplexen nach Durchlaufen der G₁-Phase unterbunden (Woo & Poon, 2003). In *Xenopus* konnte eine Interaktion von Cyclin E-Cdk2 mit Cdc6 gezeigt werden (Furstenenthal et al., 2001). Überdies wurden Mcm2-7-Proteine als Substrate von Cdks identifiziert (Bell & Dutta, 2002). Cyclin A-Cdk2 war in der Lage, Mcm4 im Mcm4,6,7-Subkomplex zu phosphorylieren, was zur Inaktivierung der Helikaseaktivität führte

(Ishimi et al., 2000). Auch ORC, RPA, PCNA und DNA-Polymerase α -Primase werden von Cdk2 phosphoryliert (Bell & Dutta, 2002; Kelly & Brown, 2000; Takeda & Dutta, 2005; Woo & Poon, 2003).

Cdc7 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die konserviert in Eukaryoten vorkommt (Kelly & Brown, 2000). Die Cdc7-Proteinkonzentration bleibt über den Zellzyklus konstant, aber die Aktivität erreicht am G₁/S-Übergang ein Maximum (Jackson et al., 1993; Yoon et al., 1993). Diese zellzyklusspezifische Aktivität wird durch Assoziation der Kinase mit der regulatorischen Untereinheit Dbf4 hervorgerufen. Das humane Dbf4-Homolog zeigt eine maximale Expression in der S-Phase (Kumagai et al., 1999; Lepke et al., 1999). Es gibt Evidenzen, dass Dbf4-Cdc7 an den Replikationsstartpunkten agiert und dort möglicherweise Komponenten des prä-replikativen Komplexes phosphoryliert (Kelly & Brown, 2000). Primäres Substrat dieser Kinase ist wahrscheinlich der Mcm2-7-Komplex. *In vitro*-Tests zeigten, dass Mcm2 ein Cdc7-Substrat ist (Brown & Kelly, 1998; Kumagai et al., 1999; Lei et al., 1997; Sato et al., 1997; Weinreich & Stillman, 1999). Auch *in vivo* existieren indirekte Hinweise dafür, dass Mcm2 durch Cdc7 phosphoryliert wird (Jiang et al., 1999a; Lei et al., 1997). Die Phosphorylierungen des Mcm2-7-Komplexes könnten zur Aktivierung der Helikaseaktivität beitragen (Kelly & Brown, 2000).

Unstrittig ist, dass Cyclin E/A-Cdk2 und Dbf4-Cdc7 essentielle Funktionen bei der Replikationsinitiation übernehmen, jedoch wird die Abfolge, in der die Serin/Threonin-Kinasen agieren, in der Literatur kontrovers diskutiert. In Hefen wird die Cdk-Aktivität vor der Cdc7-Aktivität benötigt (Nougarede et al., 2000), währenddessen im Krallenfrosch die Cdc7-Aktivität vor der Cdk-Aktivität nötig ist (Jares & Blow, 2000; Walter, 2000).

Zusätzlich zu den Kinasen werden weitere Replikationsfaktoren an die *origins* rekrutiert. Dazu zählen: *DNA polymerase β possible subunit 11* (Dpb11), *synthetically lethal with *dpb11 2** (Sld2), *synthetically lethal with *dpb11 3** (Sld3), *minichromosome maintenance 10* (Mcm10), *cell division cycle 45* (Cdc45) und *go ichi ni san* (GINS) (Bell & Dutta, 2002; Kelly & Brown, 2000; Takeda & Dutta, 2005; Teer & Dutta, 2005) (Abbildung 4).

In Hefen wird Dpb11 als Untereinheit der DNA-Polymerase ϵ gesehen (Masumoto et al., 2000) und ist essentiell für die DNA-Replikation (Araki et al., 1995; McFarlane et al., 1997). Dpb11-Homologe sind *radiation-sensitive 4* (Rad4) in *Schizosaccharomyces pombe*, *nitrogen mustard-sensitive 101* (Mus101) in *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* sowie *topoisomerase binding protein 1* (TopBP1) in Säugern (Takeda & Dutta, 2005). Mus101 spielt eine entscheidende Rolle bei der Ladung von Cdc45 und des GINS-Komplexes in das Chromatin (Hashimoto & Takisawa, 2003; Kubota et al., 2003; Van Hatten et al., 2002).

Sld2 interagiert mit Dpb11 und ist essentiell für die Replikation in Hefen (Kamimura et al., 1998; Masumoto et al., 2002). Seit 2005 ist bekannt, dass in Vielzellern RecQL4 das funktionelle Ortholog des Sld2 sein könnte, da eine limitierte aminoterminal Sequenzhomologie gefunden wurde (Machida et al., 2005; Sangrithi et al., 2005). In *Xenopus* wurde gezeigt, dass RecQL4 erst nach dem Cdc45 in das Chromatin geladen wird (Sangrithi et al., 2005).

Sld3 ist in Hefen konserviert und für die Interaktion des Mcm2-7-Komplexes mit Cdc45 wichtig (Gomez et al., 2005; Kamimura et al., 2001; Nakajima & Masukata, 2002; Yamada et al., 2004).

Mcm10 hat nur begrenzte Homologien zu Mcm2-7-Proteinen (Forsburg, 2004; Tye, 1999). In *Xenopus* und humanen Zellen wird Mcm10 in Abhängigkeit von Mcm2-7 in das Chromatin geladen (Gegan et al., 2003; Wohlschlegel et al., 2002). Die Chromatinassoziation von Mcm10 ist weiterhin eine wichtige Voraussetzung für die Rekrutierung von Cdc45 (Gegan et al., 2003; Mimura et al., 2000; Sawyer et al., 2004; Wohlschlegel et al., 2002).

Cdc45 wird als wichtiger Faktor für die Umwandlung des prä-replikativen Komplexes in den Initiationskomplex angesehen und wird außerdem für die Elongationsphase benötigt. In Abschnitt 1.3 wird Cdc45 ausführlich behandelt.

Homologe des GINS-Komplexes wurden in der Bäckerhefe, dem Krallenfrosch und humanen Zellen identifiziert (Kanemaki et al., 2003; Kubota et al., 2003; Takayama et al., 2003). GINS umschließt die DNA in einer Art Ringform und ist für die Ladung von Cdc45 nötig (Kubota et al., 2003; Takayama et al., 2003).

1.2.3 DNA-Neusynthese durch Polymerasen

Nach Entwindung der DNA und Stabilisierung der einzelsträngigen Bereiche durch *replication protein A* (RPA) wird die DNA-Synthese durch die replikativen DNA-Polymerasen α , δ und ϵ ausgeführt (Hubscher et al., 2002; Kawasaki & Sugino, 2001; Waga & Stillman, 1998) (Abbildung 5). Für *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Xenopus laevis* wurde gezeigt, dass Cdc45 essentiell für das Laden der DNA-Polymerase α -Primase in das Chromatin ist (Aparicio et al., 1999; Mimura et al., 2000; Mimura & Takisawa, 1998; Uchiyama et al., 2001b; Zou & Stillman, 2000). Für höhere Eukaryoten konnte bis jetzt keine Interaktion zwischen Cdc45 und DNA-Polymerase α -Primase gefunden werden, was möglicherweise durch eine transiente Wechselwirkung erklärbar wäre. Neuere Daten sprechen dafür, dass Mcm10 die DNA-Polymerase α -Primase lädt (De Falco et al., 2007; Fien et al., 2004; Ricke & Bielinsky, 2004). Die DNA-Polymerase α -Primase ist die einzige Polymerase, welche die DNA-Synthese *de novo* starten kann (Hubscher et al., 2002; Hubscher et al., 2000). Die Primasefunktion des Enzymkomplexes synthetisiert einen etwa 10 Nukleotide langen RNA-Primer, der anschließend durch die Polymerasefunktion um 20-30 Nukleotide zu einem RNA-DNA-Hybrid-Primer verlängert wird. Danach dissoziiert die DNA-Polymerase α -Primase vom Leit- und Folgestrang ab (Murakami & Hurwitz, 1993) und wird in einer Reaktion, die als *polymerase switch* bezeichnet wird, durch eine Elongationspolymerase ersetzt (Takeda & Dutta, 2005). Die Synthese der DNA-Tochterstränge wird durch die prozessiven DNA-Polymerasen δ und ϵ ausgeführt (Garg & Burgers, 2005; Hubscher et al., 2002). Hierfür werden auch die akzessorischen Proteine *replication factor C* (RF-C) und *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) benötigt. Der heteropentamere RF-C-Komplex ist für die Ladung von PCNA an den RNA-DNA-Primer wichtig (Waga & Stillman, 1998). PCNA umschließt die DNA-Matrize wie eine Ringklemme und wird als Prozessivitätsfaktor der DNA-Polymerasen δ und ϵ angesehen, welcher ein vorzeitiges Abdissoziieren der Polymerasen von der DNA verhindert (Prelich et al., 1987; Waga & Stillman, 1998).

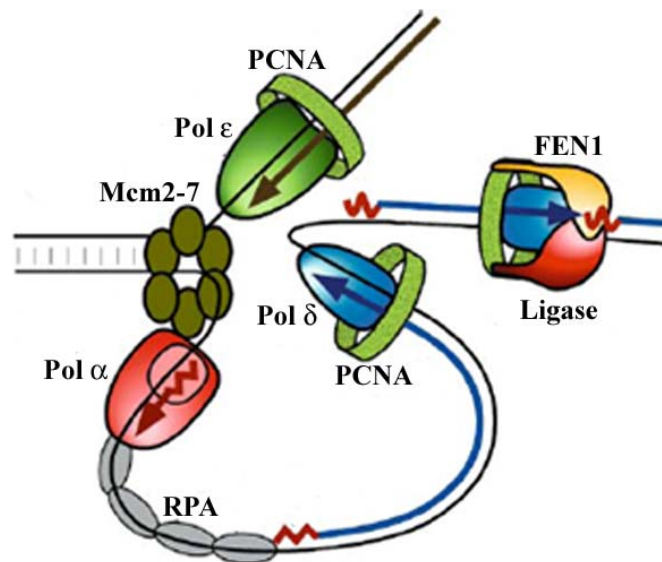


Abbildung 5: Replikationsfaktoren an der Replikationsgabel

Nach dem Posaunenmodell agiert der Mcm2-7-Komplex als Helikase, die DNA-Polymerase α -Primase synthetisiert die Primer sowie ein kurzes Stück DNA und die elongativen DNA-Polymerasen δ und ϵ übernehmen die prozessive DNA-Synthese. PCNA fungiert als Co-Faktor der Elongationspolymerasen und RPA als Stabilisator der einzelsträngigen DNA. In die finale Prozessierung der neusynthetisierten DNA-Tochterstränge sind dann FEN1 und Ligasen eingebunden. Darstellung modifiziert nach (Garg & Burgers, 2005).

1.3 Der Replikationsfaktor Cdc45

Cdc45 steht als Akronym für *cell division cycle 45* und deutet auf die Entdeckung des Gens in Hefe-Zellzyklusmutanten hin (Moir et al., 1982). Der Replikationsfaktor ist essentiell für die Initiation (Aparicio et al., 1997; Hardy, 1997; Hopwood & Dalton, 1996; Uchiyama et al., 2001a; Zou et al., 1997) und Elongation (Bauerschmidt et al., 2007; Owens et al., 1997; Pacek & Walter, 2004; Tercero et al., 2000) der DNA-Replikation im mitotischen Zellzyklus. Ferner ist Cdc45 wichtig für die prä-meiotische Replikation in *Arabidopsis thaliana* (Stevens et al., 2004).

Aufgrund der geringeren Abundanz des Cdc45-Proteins im Vergleich zu Mcms im *Xenopus*-Replikationssystem (Edwards et al., 2002; Woodward et al., 2006) wurde in der Literatur die Hypothese aufgeworfen, dass Cdc45 der limitierende Faktor für die Initiation der DNA-Replikation sein könnte (Dolan et al., 2004; Forsburg, 2004).

1.3.1 Entdeckung und chromosomale Lokalisation des Cdc45

Es wurden kältesensitive Zellzyklusmutanten von *Saccharomyces cerevisiae* isoliert und CDC45 als ein mutiertes Allel identifiziert (Moir et al., 1982). Homologe des essentiellen Replikationsfaktors fanden sich in der Bäckerhefe bis hin zum Menschen (Tabelle 2). Auch in *Arabidopsis thaliana* wurde ein CDC45-Gen identifiziert (Stevens et al., 2004). Obwohl in Archaeobakterien einige eukaryotische Replikationsproteine in entsprechenden Pendanten existieren, konnte kein Cdc45-Homolog gefunden werden (Grabowski & Kelman, 2003; Matsunaga et al., 2001).

Aufgrund der hohen Identität der Aminosäuresequenzen zwischen dem murinen und dem humanen Homologen (92%ige Identität) kann geschlussfolgert werden, dass der Replikationsfaktor innerhalb der Säugetierarten hochkonserviert ist.

Organismus	Aminosäureanzahl	Molekulargewicht	Referenzen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	650	74,2 kDa	(Hopwood & Dalton, 1996; Zou et al., 1997)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	638	73,4 kDa	(Miyake & Yamashita, 1998)
<i>Drosophila melanogaster</i>	575	65,5 kDa	(Loebel et al., 2000)
<i>Xenopus laevis</i>	567	65 kDa	(Mimura & Takisawa, 1998)
<i>Mus musculus</i>	566	65,5 kDa	(Shaikh et al., 1999)
<i>Homo sapiens</i>	566	65,5 kDa	(Kukimoto et al., 1999; Saha et al., 1998b)

Tabelle 2: Cdc45-Homologe

Die Cdc45-Homologen aus eukaryotischen Modellorganismen unterscheiden sich in ihrer Aminosäureanzahl und dem Molekulargewicht.

In der Fruchtfliege befindet sich das CDC45-Gen auf dem X-Chromosom (Loebel et al., 2000), bei der Maus wurde das Gen auf dem Chromosom 16 lokalisiert (Shaikh et al., 1999). Das humane CDC45-Gen wurde 1998 bei der Untersuchung der DiGeorge-kritischen Region mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung identifiziert. Es befindet sich auf dem Chromosom 22q11.2 in *head-to-tail*-Anordnung mit dem UFD1-Gen (McKie et al., 1998).

1.3.2 Motive im CDC45-Gen bzw. in der Cdc45-Aminosäuresequenz

Promotoranalysen der 5'-Region der humanen CDC45-DNA zeigten, dass Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren E2F und SP1 vorliegen (Arata et al., 2000). Darüber hinaus wurden E2F-Konsensussequenzen auch in der Promotorregion der *Drosophila*- (Loebel et al., 2000) sowie der *Arabidopsis thaliana*-CDC45-DNA (Stevens et al., 2004) nachgewiesen. Weiterführende Bindungsstudien sowie Reportersysteme zeigten die Assoziation von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie mit dem CDC45-Promotor (Arata et al., 2000). Diese Resultate verweisen auf eine pRb/E2F-regulierte Cdc45-Expression (Abschnitt 4.2).

Sequenzvergleiche zwischen Cdc45-Homologen aus Hefe, Fruchtfliege, Krallenfrosch, Maus und Mensch identifizierten eine konservierte Domäne mit sauren Aminosäuren (Hopwood & Dalton, 1996; Loebel et al., 2000; Miyake & Yamashita, 1998; Shaikh et al., 1999). Ferner wurde für Cdc45 in verschiedenen Modellorganismen eine putative bipartite Kernlokalisationssequenz nachgewiesen (Hopwood & Dalton, 1996; Loebel et al., 2000; Miyake & Yamashita, 1998; Zou et al., 1997).

1.3.3 Cdc45-Spleißvarianten

Die Analyse von cDNA-Klonen aus HeLa- und TIG1-Bibliotheken bewies die Existenz verschiedener humaner Cdc45-Spleißvarianten. Es stellte sich heraus, dass der überwiegende Anteil der HeLa-cDNA-Klone für ein Protein mit 566 Aminosäuren kodiert. Dieser Spleißvariante, welche mit dem von Saha et al. gefundenem Cdc45L identisch ist, fehlt Exon 7 und 36 Basenpaare des Exons 18 (Kukimoto et al., 1999; Saha et al., 1998b). Auch wurden Cdc45-Transkripte unterschiedlicher Größe in einigen adulten humanen Geweben durch Northern-Blots nachgewiesen (Shaikh et al., 1999).

1.3.4 Änderung des Cdc45-mRNA- bzw. -Proteingehaltes

Mittels Northern-Blot-Analysen konnte in *Saccharomyces cerevisiae* ermittelt werden, dass die Cdc45-mRNA-Expression am G₁/S-Übergang ein Maximum erreicht, wohingegen die Proteinmenge über den gesamten Zellzyklus konstant blieb (Hardy, 1997; Owens et al., 1997). Auch in der Spaltheefe wurde keine signifikante Veränderung des Cdc45-Proteingehaltes in den einzelnen Zellzyklusphasen gefunden (Uchiyama et al., 2001b). Saha und Mitarbeiter zeigten für humanes Cdc45 ein G₁/S-spezifisches Ansteigen der mRNA-Menge, aber die Unveränderlichkeit des Proteingehaltes im Zellzyklus (Saha et al., 1998b).

In quieszenten murinen Zellen wurde weder die Cdc45-mRNA noch das -Protein detektiert (Arata et al., 2000). Die Expression des Cdc45-Proteins konnte in Rattenfibroblasten durch Applikation von Serum oder Metallionen in der späten G₁-Phase induziert werden (Arata et al., 2000).

1.3.5 Cdc45-Expression in embryonalen und adulten Geweben

Die höchsten Cdc45-Proteinmengen konnten in 0-4 Stunden alten *Drosophila*-Embryonen gefunden werden, da dort eine rasche Proliferation notwendig ist (Loebel et al., 2000).

Mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen wurde die Expression des humanen Cdc45 in verschiedenen fötalen und adulten Geweben bestimmt. Die höchsten mRNA-Mengen konnten in adulten Testis und dem Thymus sowie in der fötalen Leber detektiert werden. Darüber hinaus wurde mRNA sowohl in der Plazenta und dem Kolon, als auch in folgenden fötalen Geweben gefunden: Thymus, Schilddrüse, Lunge und Niere. Hingegen konnte das humane Cdc45-Transkript in adulten Organen mit sehr geringer Proliferationsrate wie beispielsweise der Leber, dem Gehirn und der Niere nicht nachgewiesen werden (Shaikh et al., 1999).

1.3.6 Subzelluläre Lokalisation des Cdc45-Proteins

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation des Cdc45 wurden in *Saccharomyces cerevisiae* Konstrukte mit *green fluorescent protein* und *hemagglutinin* exprimiert. Das Cdc45-Fusionsprotein lag ausschließlich nukleär vor, und es konnte zellzyklusabhängig keine Lokalisationsveränderung festgestellt werden (Hopwood & Dalton, 1996; Owens et al., 1997).

Immunfluoreszenzstudien und die Präparation von fraktionierten Zellextrakten zeigten demgegenüber eine zellzyklusabhängige Änderung der Cdc45-Lokalisation in Fruchtfliegen-Embryonen. Während der Interphase war der Replikationsfaktor in *Drosophila*-Embryonen chromatinassoziiert, hingegen wurde eine Ablösung vom Chromatin in der späten Prophase beobachtet. Darüber hinaus konnte das Cdc45-Protein bis zur späten Anaphase bzw. Telophase nicht nachgewiesen werden (Loebel et al., 2000).

Biochemische Fraktionierungen von U2OS-Zellen verdeutlichten, dass das humane Cdc45-Protein in der S-Phase nukleär und zytosolisch lokalisiert war, währenddessen es in der Mitose ausschließlich im Zytosol detektiert wurde (Saha et al., 1998b).

1.3.7 Mutanten / Depletion / *knock-down* / *knock-out* / Mikrodeletion des Cdc45

Thermosensitive CDC45-Hefemutanten zeigten einen Arrest am G₁/S-Übergang (Hennessy et al., 1991; Hopwood & Dalton, 1996; Miyake & Yamashita, 1998; Uchiyama et al., 2001a; Zou et al., 1997).

Auch die Depletion des Cdc45-Proteins mit spezifischen Antikörpern resultierte in der Inhibierung der Replikationsinitiation und -elongation in Oozyten-Extrakten des Krallenfrosches (Mimura & Takisawa, 1998; Pacek & Walter, 2004).

Der *RNA interference* (RNAi)-vermittelte *knock-down* des Cdc45 führte in *Drosophila melanogaster* zu Defekten in der Chromosomenkondensation (Christensen & Tye, 2003). Gleichfalls wurden in *Arabidopsis thaliana* fragmentierte Chromosomenen nach RNAi-Behandlung gefunden (Stevens et al., 2004). Die Anwendung von Antisense-Oligodesoxynukleotiden gegen Cdc45 oder RNAi-*knock-down* führten in humanen Tumorzelllinien zur Apoptose (Feng et al., 2003).

Bei heterozygoten CDC45^{+/-}-Mäusen wurden im Beobachtungszeitraum von 6 Monaten keine anatomischen Abnormalitäten gefunden (Yoshida et al., 2001). Demgegenüber waren homozygote CDC45^{-/-}-Mäuse nicht lebensfähig. Sie verstarben im peri-Implantationsstadium der Blastozyste vor dem 7,5. Tag, da maternales oozytäres Cdc45 nur für etwa sieben Zellteilungen ausreicht. Die Präimplantationsmortalität der CDC45-*knock-out*-Mäuse verweist deutlich auf die Essentialität des Replikationsfaktors für die normale Embryonalentwicklung von Säugetieren.

Mikrodeletionen der chromosomalen Region 22q11 sind mit Entwicklungsanomalien assoziiert, die beim Menschen unter der Bezeichnung 22q11-Deletionssyndrome zusammengefasst werden. Bei den meisten Betroffenen wurde die Deletion eines Bereiches von mehr als zwei Megabasen nachgewiesen. Es wird angenommen, dass die daraus resultierende Haploinsuffizienz eines oder mehrerer Gene eine wichtige Rolle in der Pathogenese der 22q11-Deletionssyndrome spielt (Budarf & Emanuel, 1997). Zu den 22q11-Deletionssyndromen zählt unter anderem auch das DiGeorge-Syndrom (DiGeorge, 1968). Phänotypisch treten hierbei gehäuft Nebenschilddrüsen- und Thymus-Hypoplasien, die mit Immunschwäche und Hypokalzämie einhergehen, sowie Aorten- und Herzanlagefehlbildungen auf (Shaikh et al., 1999). Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen zeigten, dass bei einem Großteil der DiGeorge-Patienten eine monoallele Mikrodeletion im Bereich 22q11 auftrat, wovon auch das CDC45-Gen betroffen ist. Diese Monoallele kann zu einer verringerten Expression des Cdc45 führen. Durch die reduzierte Menge des Cdc45-Proteins, welches essentiell für die DNA-Replikation und damit Zellproliferation ist, könnte es während der Embryonalentwicklung zu den beschriebenen Unterentwicklungen der Nebenschilddrüse und des Thymus kommen (Baldini, 1999).

1.3.8 Regulation der Cdc45-Chromatinassoziation

Die *origins of replication* werden zu verschiedenen Zeiten in der S-Phase aktiviert (Fangman & Brewer, 1992). Cdc45 wird früh an frühe *origins* rekrutiert, aber deutlich später an *origins*, die erst in der späten S-Phase aktiviert werden (Aparicio et al., 1999; Zou & Stillman, 2000). Die zeitversetzte Bindung von Cdc45 an die Replikationsstartpunkte wird gleichbedeutend mit deren Aktivierung gesehen (Vogelauer et al., 2002; Zou & Stillman, 2000). Für die Rekrutierung von Cdc45 zeichnen sich Replikationsfaktoren, Kinasen und Phosphatasen verantwortlich. Die Funktionen von Mcm2-7, Sld3, Mus101, Mcm10 und GINS wurden bereits in den Abschnitten 1.2.1 und 1.2.2 dargestellt.

Bis heute konnte nicht geklärt werden, ob Cdc45 ein direktes Ziel Cdk-abhängiger Phosphorylierungen ist (Kelly & Brown, 2000). Jedoch wurde in einem *in vitro*-Test gefunden, dass Cdc45 in *Saccharomyces cerevisiae* von Cdc7 phosphoryliert wird, wobei allerdings unklar

ist, ob die Phosphorylierungen einen Einfluss auf die Funktion des Replikationsfaktors haben (Weinreich & Stillman, 1999). Akzeptiert ist jedoch, dass nach Assemblierung des prä-replikativen Komplexes die Ladung von Cdc45 in das Chromatin sowohl durch Cdks als auch durch Cdc7 reguliert wird (Aparicio et al., 1999; Aparicio et al., 1997; Dolan et al., 2004; Jares & Blow, 2000; Mimura & Takisawa, 1998; Van Hatten et al., 2002; Yabuuchi et al., 2006; Zou & Stillman, 1998). Die parallele Aktivität von Cdks und Cdc7 impliziert, dass die Replikationsinitiation und hier im Speziellen die Ladung des Cdc45-Proteins zwei unabhängige Signale benötigt (Takeda & Dutta, 2005). In *Xenopus*-Oozyten war zudem die Aktivität der Protein-Phosphatase 2A für die Chromatinassoziation des Cdc45-Proteins notwendig (Chou et al., 2002; Lin et al., 1998; Petersen et al., 2006).

Replikativer Stress oder auftretende DNA-Schäden aktivieren den intra-S-Phase-Kontrollpunkt (Machida et al., 2005). In *Saccharomyces cerevisiae* und *Xenopus laevis* wird nach Erkennung von DNA-Schäden die Ladung von Cdc45 an späte *origins* unterbunden und damit die Replikationsinitiation verhindert (Aparicio et al., 1999; Costanzo et al., 2003; Petersen et al., 2006). Dieser Mechanismus scheint konserviert zu sein, da in humanen Zellen eine Schädigung der DNA durch ionisierende Strahlung oder Benzo[a]pyren dasselbe Resultat erbrachte (Falck et al., 2002; Liu et al., 2006). Wurden die Signalwege von *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) sowie *ATM and Rad-3 related* (ATR) durch Koffein ausgeschaltet, akkumulierte Cdc45 am Chromatin (Costanzo et al., 2003; Falck et al., 2002; Shechter et al., 2004). Unter den vielen Proteinen, die in die Cdc45-Ladung involviert sind, werden Cdks und Cdc7 als kritische Ziele der aktivierten ATM/ATR-Kinasen gesehen. So inhibiert der ATM-vermittelte Signalweg die Aktivität der Cdks (Costanzo et al., 2000; Shechter et al., 2004), währenddessen der ATR-vermittelte Signalweg die Cdc7-Kinase inhibiert (Costanzo et al., 2003; Shechter et al., 2004).

Erst kürzlich wurde ATM/ATR auch mit der Regulation der DNA-Replikation in ungeschädigten Zellen in Verbindung gebracht (Fisher & Mechali, 2004; Shechter et al., 2004; Shechter & Gautier, 2005). ATM/ATR unterbindet die Aktivierung von distalen *origins* durch Inhibierung von Cdks, Cdc7 und des Mcm2-7-Komplexes.

Bemerkenswerterweise interagierte Cdc45 mit den *checkpoint*-Faktoren Mrc1, Tof1 sowie TopBP1-Homologen (Tabelle 3). Claspin wird für die Aktivierung des S-Phase-Kontrollpunktes nach Erkennung von pausierenden Replikationsgabeln benötigt (Kumagai & Dunphy, 2000). Das Claspin-Homolog in Hefen, Mrc1, und Tof1 werden erst nach Cdc45 in das Chromatin geladen und laufen mit der Replikationsgabel mit (Katou et al., 2003; Osborn & Elledge, 2003). Kommt es zum Stopp der Replikationsgabelprogression, sorgen wahrscheinlich Mrc1, Tof1 und weitere Faktoren für die Integrität der Replikationsmaschinerie, d.h. eine Deassemblierung des Mcm2-7-Komplexes, des Cdc45, des GINS-Komplexes und der elongativen DNA-Polymerasen wird verhindert (Calzada et al., 2005; Katou et al., 2003; Nitani et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ATM/ATR-Signalwege für den normalen Ablauf der Replikation sowie für die Schadensantwort nach Anhalten der Replikationsgabel wichtig sind.

1.3.9 Interaktionspartner und putative molekulare Funktionen des Cdc45

Zum einen wurden durch Mutationsanalysen in Hefen genetische Interaktionen nachgewiesen. Zum anderen konnten Interaktionspartner des Cdc45 mittels *two hybrid*- und *pull-down*-Technik sowie durch Co-Immunpräzipitationen identifiziert werden. In [Tabelle 3](#) sind die in der Literatur beschriebenen Interaktionspartner aufgelistet.

Cdc45-Interaktion mit	Referenzen
ORC-Komplex	(Kneissl et al., 2003; Saha et al., 1998b)
Mcm2-7-Komplex	(Bauerschmidt et al., 2007; Dalton & Hopwood, 1997; Dolan et al., 2004; Gambus et al., 2006; Hennessy et al., 1991; Hopwood & Dalton, 1996; Kneissl et al., 2003; Kubota et al., 2003; Kukimoto et al., 1999; Loebel et al., 2000; Masai et al., 2006; Masuda et al., 2003; Mimura & Takisawa, 1998; Moyer et al., 2006; Pacek et al., 2006; Pacek & Walter, 2004; Uchiyama et al., 2001b; Zou & Stillman, 2000)
Mcm10	(Christensen & Tye, 2003; Gregan et al., 2003; Homesley et al., 2000; Loebel et al., 2000; Ramachandran et al., 2004; Sawyer et al., 2004)
Sld3	(Kamimura et al., 2001; Nakajima & Masukata, 2002; Yamada et al., 2004)
GIN5-Komplex	(Bauerschmidt et al., 2007; Gambus et al., 2006; Kubota et al., 2003; Moyer et al., 2006; Pacek et al., 2006)
RPA	(Bauerschmidt, 2006; Dalton & Hopwood, 1997; Zou & Stillman, 2000)
DNA-Polymerase α	(Aparicio et al., 1999; Hashimoto & Takisawa, 2003; Kubota et al., 2003; Kukimoto et al., 1999; Mimura et al., 2000; Mimura & Takisawa, 1998; Uchiyama et al., 2001a; Uchiyama et al., 2001b)
DNA-Polymerase δ	(Bauerschmidt et al., 2007)
DNA-Polymerase ϵ	(Bauerschmidt et al., 2007; Kubota et al., 2003; Zou & Stillman, 2000)
Rad4/Mus101/TopBP1	(Hashimoto & Takisawa, 2003; Wollmann, 2005)
Mrc1/Clsapin	(Katou et al., 2003)
Tof1	(Katou et al., 2003)

Tabelle 3: Interaktionspartner des Cdc45

Durch genetische Studien und Interaktionsanalysen konnten eine Vielzahl von Cdc45-Interaktionspartnern identifiziert werden.

Als Interaktionspartner des Cdc45 wurden Untereinheiten des Mcm2-7- und des GINS-Komplexes identifiziert ([Tabelle 3](#)). Es konnte gezeigt werden, dass sich Cdc45 gemeinsam mit dem Mcm2-7-Komplex vom *origin* in Richtung der Replikationsgabel bewegt ([Aparicio et al., 1997](#); [Zou & Stillman, 2000](#)). Die Ladung von Cdc45 in das Chromatin wird überdies als entscheidender Schritt für die Aktivierung der Mcm2-7-Helikase gesehen ([Machida et al., 2005](#)). Außerdem bestand eine gereinigte Helikase aus *Xenopus*-Oozytenextrakt aus allen sechs Untereinheiten des Mcm2-7-Komplexes sowie dem Cdc45-Protein ([Masuda et al., 2003](#)).

Es wurde postuliert, dass Cdc45 ein Co-Faktor bzw. akzessorisches Protein der Mcm2-7-Helikase sein könnte ([Kearsey & Cotterill, 2003](#); [Pacek & Walter, 2004](#)). Zwei Publikationen aus dem vergangenen Jahr berichteten von der Isolierung eines hochmolekularen Cdc45-Mcm2-7-GINS-Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae* ([Gambus et al., 2006](#)) und *Drosophila melanogaster* ([Moyer et al., 2006](#)), welcher intrinsische Helikaseaktivität besaß. Dieser Komplex könnte, zusammen mit bisher nicht identifizierten weiteren Replikationsfaktoren, Bestandteil einer makromolekularen Struktur sein, die als *unwindosome* bezeichnet wird ([Aparicio et al., 2006](#)) ([Abbildung 6](#)).

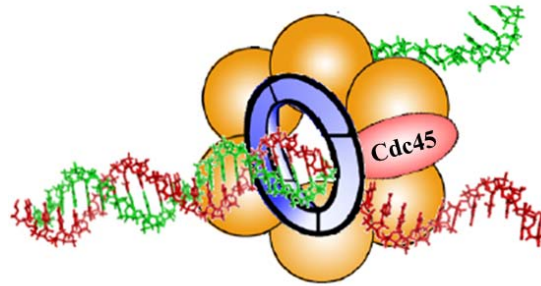


Abbildung 6: Cdc45 als eine strukturelle Komponente eines Multiprotein-Komplexes mit Helikaseaktivität

Cdc45 (rot) und der GINS-Komplex (blau) könnten als Co-Faktoren des Mcm2-7-Komplexes (orange) während der DNA-Replikation fungieren. Darstellung modifiziert nach (Aparicio et al., 2006).

Cdc45 interagiert auch mit DNA-Polymerasen (Tabelle 3). Vorstellbar wäre, dass Cdc45 die Helikase- und Polymeraseaktivität koordiniert (Kelly & Brown, 2000; Tercero et al., 2000). Möglicherweise ist die Mcm2-7-Helikase solange inaktiv, bis die replikativen DNA-Polymerasen, vermittelt durch Cdc45, angebunden sind. Cdc45 könnte ähnlich dem prokaryotischen Tau ein Verbindungsprotein zwischen Helikase und Polymerase sein (Baker & Bell, 1998; Bauerschmidt et al., 2007; Kim et al., 1996) (Abbildung 7). Ein Sequenzvergleich von eukaryotischen Cdc45- und prokaryotischen Tau-Homologen zeigte bereits limitierte Sequenzidentitäten bzw. -ähnlichkeiten (Bauerschmidt, 2006).

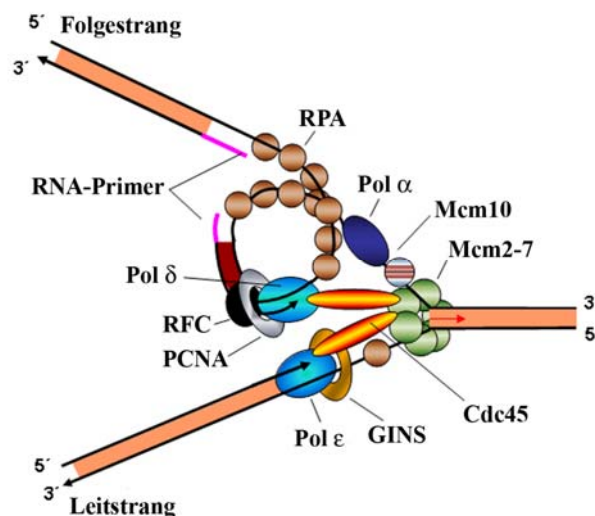


Abbildung 7: Cdc45 als Verbindungsprotein zwischen dem Mcm2-7-Komplex und den DNA-Polymerasen δ/ε

Im humanen Zellsystem wurden Protein-Protein-Interaktionen zwischen Cdc45, dem Mcm2-7-Komplex, dem GINS-Komplex und den DNA-Polymerasen δ und ε nachgewiesen (Tabelle 3). Cdc45 könnte die Funktion eines Verbindungsproteins zwischen der replikativen DNA-Helikase Mcm2-7 und den elongativen DNA-Polymerasen δ und ε übernehmen. Darstellung modifiziert nach (Bauerschmidt et al., 2007).

1.4 Wege für Zellen, den mitotischen Teilungszyklus zu verlassen

Der Hauptanteil der Zellen im menschlichen Organismus proliferiert nicht mehr. Dabei können die Zellen temporär oder permanent den mitotischen Teilungszyklus in der G₁-Phase verlassen haben. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass eine somatische Zelle reversibel in der G₀-Phase verharret. Andererseits kann eine Zelle durch den Übergang in die Seneszenz oder terminale Differenzierung einen irreversiblen G₁-Arrest erfahren (Abbildung 8).

Kontinuierlich proliferierende Zellen finden sich im menschlichen Körper in bestimmten Nischen, wie beispielsweise Stammzellen in den Kolon-Krypten, in der epidermalen Basalregion der Haut oder im Knochenmark (Aguda, 2001; Hall & Watt, 1989).

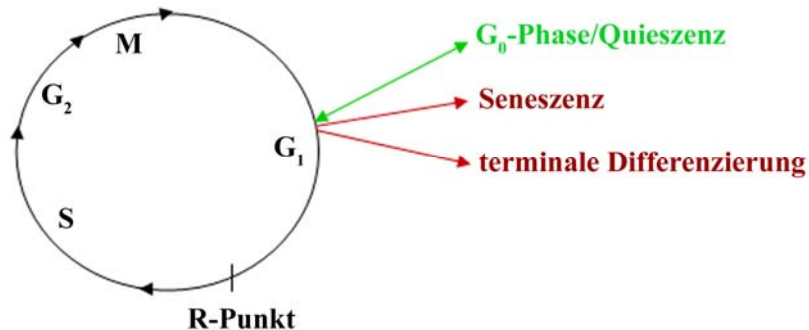


Abbildung 8: Wege aus dem mitotischen Zellteilungszyklus

Somatische Zellen sind bis zum Überschreiten des Restriktionspunktes (R-Punkt) in der G₁-Phase auf eine kontinuierliche Stimulation durch Wachstumsfaktoren angewiesen. Sind diese Mitogene limitiert, können die Zellen reversibel für einige Zeit in die G₀-Phase/Quieszenz übergehen und diese dann wieder nach geeigneter Stimulation verlassen. Auch können somatische Zellen einen irreversiblen G₁-Arrest erfahren, wenn sie seneszent oder terminal differenziert sind.

1.4.1 Übergang der Zellen in die G₀-Phase

Somatische Zellen benötigen bis zum Überschreiten des Restriktionspunktes in der G₁-Phase die kontinuierliche Stimulation durch Wachstumsfaktoren (Pardee, 1989; Riddle et al., 1979). Das Durchlaufen der nachfolgenden Zellzyklusphasen ist dann unabhängig vom Vorhandensein mitogener Faktoren (Reed, 1997; Zetterberg et al., 1995). Zellen können bei einem Mangel an Mitogenen während der frühen G₁-Phase aus dem Zellzyklus ausscheren und Stunden bis Jahre in der so genannten G₀-Phase/Quieszenz verharren (Iyer et al., 1999). Diese quieszenten Zellen sind weiterhin metabolisch aktiv aber deutlich kleiner als zyklisierende Zellen (Pellicciari et al., 1995). Nach mitogener Stimulation können die Zellen die G₀-Phase wieder verlassen und in den Zellzyklus zurückkehren. Als Beispiele für quieszente Zellen können Hepatozyten (Alison & Lovell, 2005; Zimmermann, 2002) sowie unstimulierte periphere T-Lymphozyten (Lea et al., 2003) angeführt werden. Für letztere wurde postuliert, dass die Quieszenz eine Reduktion des Bedarfs an Energie und Platz mit sich bringt, wodurch im Körper ein großes Repertoire an T-Zellen erhalten werden kann (Yusuf & Fruman, 2003).

1.4.2 Übergang der Zellen in die Seneszenz

Humane Fibroblasten besitzen *in vitro* nur ein limitiertes Proliferationspotential. Nach einer kritischen Zahl von Populationsverdopplungen bzw. Passagen, dem Hayflick-Limit, teilen sich die Zellen nicht mehr und gehen in die replikative Seneszenz über (Hayflick & Moorhead, 1961). Die zelluläre Seneszenz kann aber auch durch Überexpression von Onkogenen, oxidativen Stress oder toxische Stoffe induziert werden (Lundberg et al., 2000; Roninson et al., 2001; Serrano et al., 1997). Seneszente Zellen sind metabolisch aktiv (Campisi, 1997a; Campisi, 1997b; Goldstein, 1990), irreversibel in der G₁-Phase arretiert und zeigen im Gegensatz zu quieszenten Zellen keine Proliferationsaktivität nach mitogener Stimulation (Campisi, 1997a). Der seneszente Phänotyp

zeichnet sich ferner durch charakteristische morphologische und metabolische Veränderungen aus, die in [Abschnitt 3.2.3](#) beschrieben werden.

1.4.3 Übergang der Zellen in die terminale Differenzierung

Eine weitere Möglichkeit den Zellzyklus permanent zu verlassen, ist die terminale Differenzierung von Zellen ([Hall & Watt, 1989](#)), welche aufgrund einer modifizierten Genexpression charakteristische phänotypische Veränderungen aufweisen ([Lajtha, 1979](#)). Differenzierte Zellen haben zwar die Fähigkeit zur Proliferation verloren, übernehmen aber spezielle Funktionen im Organismus ([Myster & Duronio, 2000](#)). Bekannte Beispiele dieser Kategorie sind Herzmuskelzellen oder Neuronen.

1.4.4 Übergang der Zellen in die Apoptose

Die Anzahl der Zellen in einem Gewebe wird durch die Rate der Zellteilung, der Zelleinwanderung sowie des Zelltods bestimmt ([Raff, 1996](#)). Es werden mindestens zwei Wege des Zelltods unterschieden, die Apoptose und die Nekrose. Der Begriff Apoptose wurde von Kerr, Wyllie und Currie geprägt, die damit eine Reihe morphologischer Veränderungen definierten, die im Lebergewebe nach Entzug von Wachstumsfaktoren zu beobachten waren ([Kerr et al., 1972](#)). Es handelt sich um einen genetisch determinierten, aktiven Vorgang zur Eliminierung von überflüssigen oder geschädigten Zellen. Dabei wurden die grundlegenden Mechanismen des programmierten Zelltods sowohl bei Tieren ([Bursch et al., 1992](#); [Wyllie et al., 1980](#)), als auch bei Pflanzen ([Greenberg et al., 1994](#)) beobachtet. Dazu zählen Zytoplasmaschrumpfung, Verlust der Phospholipidassymmetrie der Zellmembran, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Kondensation und Fragmentierung des Chromatins und Bildung von membranumschlossenen Vesikeln. Diese *apoptotic bodies* werden *in vivo* durch Phagozyten eliminiert, so dass im Gewebe Entzündungsreaktionen durch freigesetzte lytische Enzyme unterbleiben. Das apoptotische Programm kann extrinsisch oder rezeptorvermittelt bzw. intrinsisch unter Beteiligung der Mitochondrien induziert werden.

Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteasen (Caspasen) sind Schlüsselmoleküle des apoptotischen Zelltods in einer Vielzahl von Organismen ([Kumar & Lavin, 1996](#); [Nicholson & Thornberry, 1997](#)). Caspasen sind für die Degradation einer begrenzten Anzahl zellulärer Proteine verantwortlich. Bisher sind mehr als 60 Caspase-Substrate in Säugerzellen identifiziert worden ([Chang & Yang, 2000](#); [Stroh & Schulze-Osthoff, 1998](#)). Vor kurzem wurden auch einige Replikationsfaktoren als neue Caspase-Substrate beschrieben, worauf in den [Abschnitten 3.2.6 und 4.4](#) genauer eingegangen wird.

1.5 Proliferationsmarker in der Tumorphathologie

Zur Erhaltung der Gewebekomöostase ist ein dynamisches Gleichgewicht von Zellvermehrung und Zelltod notwendig. Ein prominentes Charakteristikum von Tumorzellen ist die deregulierte zelluläre Proliferation ([Evan & Vousden, 2001](#)), da Tumorzellen spezifische Fähigkeiten erworben haben, die ihr ungehemmtes Wachstum begünstigen ([Hanahan & Weinberg, 2000](#)) ([Abbildung 9](#)). Molekulare Analysen von Tumoren zeigten, dass häufig Regulatoren des Zellzyklus mutiert bzw. funktionell inaktiviert sind ([Malumbres & Barbacid, 2005](#)).

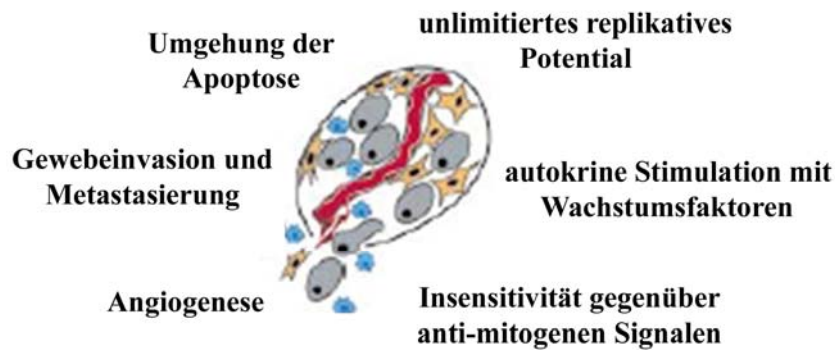


Abbildung 9: Molekulare Eigenschaften von Tumorzellen

Tumorzellen haben Fähigkeiten erworben, mit deren Hilfe eine deregulierte Proliferation möglich ist. Darstellung modifiziert nach (Hanahan & Weinberg, 2000).

Bei Krebserkrankungen orientieren sich Diagnose, Prognoseabschätzung und Therapieempfehlung an histopathologischen Aussagen zur Tumorart (*typing*), Tumorausbreitung (*staging*) und zum Malignitätsgrad (*grading*). Die Beurteilung der malignen Potenz von Tumoren bezieht sich auf diverse histologisch definierbare Graduierungsmarker wie Proliferation, Differenzierung, Nekroseneigung, Invasivität und Metastasierungsfähigkeit (Donhuijsen, 1998).

Die Bestimmung der proliferierenden Tumorzellpopulation bietet als Graduierungsparameter den Vorteil eines einheitlichen und quantitativ gut erfassbaren Merkmals (Donhuijsen, 1998). Die Proliferation kann zum einen direkt durch Ermittlung des mitotischen Index oder des DNA-Gehaltes dargestellt werden (Hall & Levison, 1990). Zum anderen wird routinemäßig in pathologischen Laboren die Proliferation indirekt über die Expression proliferationsassoziierter Antigene erfasst (Hall & Levison, 1990). Als Marker werden immunhistochemisch an Tumorgewebeschnitten vor allem Kiel-67/Molecular Immunology Borstel-1 (Ki-67/MIB-1) oder PCNA dargestellt und quantifiziert (Bruno et al., 1992; Hall & Levison, 1990; Rose et al., 1994; van Diest et al., 1998; Wilkinson & Hendricks, 1995). Seit wenigen Jahren werden auch Replikationsproteine als putative neue Proliferationsmarker diskutiert und experimentell untersucht (Abschnitte 3.6 und 4.6).

1.6 Zielstellung

Gegenwärtig ist nur sehr wenig über den humanen Replikationsfaktor Cdc45 bekannt, da die meisten Studien an niederen eukaryotischen Modellorganismen durchgeführt wurden. Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Regulation des essentiellen Cdc45-Proteins in humanen Zellen besser zu verstehen. Folgende Aspekte sollten experimentell untersucht werden:

1. Analyse der Expression des humanen Cdc45-Proteins in verschiedenen Zellzyklusstadien (G₁-, S-, G₂- und M-Phase) proliferierender Zellen
2. Analyse der Regulation des humanen Cdc45-Proteins in Zellen, die den Zellteilungszyklus temporär (Übergang in die G₀-Phase) oder permanent (Übergang in die Seneszenz oder terminale Differenzierung) verlassen haben
3. Bestimmung des Zeitpunktes der Cdc45-Proteinneusynthese nach Wiedereintritt reversibel G₀-arretierter Zellen in den Zellzyklus
4. Untersuchung, ob humanes Cdc45 im Zuge des programmierten Zelltods definiert gespalten wird
5. Ermittlung der Halbwertszeit des humanen Cdc45-Proteins in humanen Zelllinien durch Cycloheximid-Inkubation bzw. radioaktive metabolische Markierung
6. Bestimmung der Cdc45-Molekülzahl je humaner Zelle
7. Vergleich der Expression des Cdc45-Proteins in humanen Primärzelllinien mit Karzinomzelllinien verschiedener Ursprungsgewebe
8. Test des Cdc45-spezifischen Antikörpers C45-3G10 für immunhistochemische Applikationen

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Zelllinie	Kultivierungsbedingungen	Bemerkungen
HeLa S3	DMEM + 10% FCS 10% CO ₂ , 37°C	- humane Cervixkarzinom-Zellen - epithelartig, adhären - Bezugsquelle: ATCC
HEp2	DMEM + 10% FCS 10% CO ₂ , 37°C	- humane Cervixkarziom-Zellen - epithelartig, adhären - Bezugsquelle: P. Hemmerich, FLI, Jena
MCF-7	RPMI + 10% FCS 5% CO ₂ , 37°C	- humane Mammakarzinom-Zellen - epithelartig, adhären - Bezugsquelle: ATCC
BT-20	DMEM + 10% FCS 10% CO ₂ , 37°C	- humane Mammakarzinom-Zellen - epithelartig, adhären - Bezugsquelle: J. Clement, Uniklinik, Jena
T98G	RPMI + 10% FCS 5% CO ₂ , 37°C	- humane Glioblastom-Zellen - fibroblastenartig, adhären - Bezugsquelle: ATCC
Saos-2	DMEM + 10% FCS 10% CO ₂ , 37°C	- humane Osteosarkom-Zellen - epithelartig, adhären - Bezugsquelle: ATCC
MRC-5	DMEM + 10% FCS 10% CO ₂ , 37°C	- primäre humane embryonale Lungenfibroblasten - adhären - Bezugsquelle: ATCC
WI-38	DMEM + 10% FCS 10% CO ₂ , 37°C	- primäre humane embryonale Lungenfibroblasten - adhären - Bezugsquelle: ATCC
HEF	DMEM + 10% FCS 10% CO ₂ , 37°C	- primäre humane embryonale Lungenfibroblasten - adhären - Bezugsquelle: U. Schmidt, HKI, Jena
CEM	RPMI + 10% FCS 5% CO ₂ , 37°C	- humane Leukämie-Zellen (akute lymphoblastische Leukämie) - lymphoblastenartig, in Suspension - Bezugsquelle: ATCC
Jurkat	RPMI + 10% FCS 5% CO ₂ , 37°C	- humane Leukämie-Zellen (akute T-Zell Leukämie) - lymphoblastenartig, in Suspension - Bezugsquelle: L. Wollweber, FLI, Jena
HL60	RPMI + 20% FCS 5% CO ₂ , 37°C	- humane Leukämie-Zellen (akute promyelozytische Leukämie) - myeloblastenartig, in Suspension - Bezugsquelle: ATCC
K-562	RPMI + 10% FCS 5% CO ₂ , 37°C	- humane Leukämie-Zellen (chronische myeloische Leukämie) - lymphoblastenartig, in Suspension - Bezugsquelle: ATCC
U-937	RPMI + 10% FCS 5% CO ₂ , 37°C	- humane Lymphom-Zellen - monozytenartig, in Suspension - Bezugsquelle: ATCC
primäre Lymphozyten		- Isolation von primären peripheren Lymphozyten durch Ficoll®-Zentrifugation aus Frischblut von K. Pollok

Tabelle 4: verwendete humane Zelllinien

2.2 Kultivierung und Ernte der Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden steril unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die verwendeten Medien und Lösungen waren auf 37°C vorgewärmt. In Abhängigkeit von der Zelllinie (Tabelle 4) wurde als Kulturmedium Dulbeccos modified Eagles Medium (DMEM) oder Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) verwendet. Als Supplement enthielten die Medien 10% bzw. 20% (v/v) hitzeinaktiviertes (30 min, 56°C) fetal calf serum (FCS). Vor der

Subkultivierung wurden die Zellen zunächst lichtmikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie und Konfluenz beurteilt.

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte in beschichteten Plastikgewebekulturflaschen oder -schalen variabler Größe. Das alte Medium wurde vollständig abgesaugt und der Zellrasen einmal mit 1x PBS/10 mM EDTA pH 8,0 gewaschen. Mit 1x Trypsin-Lösung erfolgte dann eine Inkubation bei 37°C, bis sich die Zellen vom Kulturgefäßboden ablösten. Danach wurde frisches Medium zugegeben und die resuspendierten Zellen in neue Kulturgefäße ausgesät.

Suspensionszellen wurden in unbeschichteten Plastikgewebekulturflaschen gehalten. Die Subkultivierung erfolgte hier durch Überführung eines Teils der Zellsuspension in frisches Medium.

Zur Bestimmung von Zellzahlen und Zellvitalität wurde der Trypanblau-Exklusionstest durchgeführt. Der makromolekulare Farbstoff kann nicht durch die intakte Zellmembran lebender Zellen penetrieren (ungefärbte Zellen), hingegen dringt er in tote Zellen ein und bindet dort an Proteine (blaugefärbte Zellen). Zur Durchführung des Tests wurden 10 µl Zellsuspension entnommen und mit 10 µl einer Trypanblau-Lösung versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde diese Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer (Superior) aufgegeben. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch, wobei mindestens vier Großquadrate ausgezählt wurden.

Trypanblau-Lösung: 0,4% (w/v) Trypanblau in 1x PBS

Suspensionskulturen wurden zur Zellernte in 15 bzw. 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Ernte von adhärenenten Zellen erfolgte entweder durch Trypsinierung oder unter Verwendung eines Plastischabers, mit dem die Zellen vorsichtig vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und entsprechend in 15 bzw. 50 ml Reaktionsgefäße überführt wurden. Als Nächstes erfolgte eine Zentrifugation bei 220 xg, 2 min und 15°C (Hettich, Rotana 46RC). Das Zellsediment wurde nun zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C bzw. -80°C aufbewahrt.

2.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden zur langfristigen Sicherung des Zellbestandes in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 220 xg, 2 min und 4°C (Hettich, Rotana 46RC) zentrifugiert. Das im Einfrierpuffer resuspendierte Zellsediment konnte anschließend in Kryogefäße überführt werden. Um den Einfrierprozess so schonend wie möglich zu gestalten, wurden die Kryogefäße in eine Styroporschachtel gestellt, für einen Tag bei -20°C und für einen weiteren bei -80°C aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff.

Zur Rekultivierung von Zellen für entsprechende Experimente wurden die gefrorenen Zellen im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und sofort in 9 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation bei 220 xg, 2 min bei 15°C (Hettich, Rotana 46RC) erfolgte die Resuspension der Zellen in frischem Medium und die Kultivierung in Gewebekulturflaschen mit

25 cm² Wachstumsfläche. Zur Sicherstellung optimaler Wachstumsbedingungen wurde das Medium nach einigen Stunden gewechselt.

Einfrierpuffer: 90% (v/v) FCS
 10% (v/v) DMSO

2.4 Synchronisation von Zellen

Jede Zellpopulation zeigt in Kultur eine charakteristische Verteilung der Zellen in den einzelnen Zyklusphasen. Dabei befindet sich zumeist, bedingt durch die Länge der Phase, der größte Anteil der Zellen in der G₁-Phase. Zum Studium der Veränderung des Proteingehaltes und der subzellulären Lokalisation humaner Replikationsfaktoren in der G₀-, G₁-, S-, G₂- und M-Phase wurden Zellen synchronisiert, wodurch eine Anreicherung an definierten Punkten im Zellzyklus erreicht wurde (Jackman & O'Connor, 1998).

2.4.1 Synchronisation am Übergang G₁-/S-Phase

Zur reversiblen Arretierung von HeLa S3- und T98G-Zellen am G₁-/S-Übergang wurden sequentiell zwei Applikationen mit Thymidin-desoxy-Ribose (TdR; 1-[2-Desoxy-β-D-ribofuranosyl]-5-methyluracil) durchgeführt (Bootsma et al., 1964; Xeros, 1962). Angriffspunkt des TdR ist die Ribonukleotid-Reduktase, welche durch einen *feedback*-Mechanismus inhibiert wird (Thomas & Lingwood, 1975). Dieses Enzym katalysiert auf Ebene der Diphosphate die Umwandlung von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden. Somit ist die endogene Synthese der für die DNA-Replikation essentiellen dNTP-Präkursoren gehemmt und die Zellen reichern sich am G₁-/S-Übergang an. Ein Großteil der Zellen geht zwei Stunden nach Entfernen des hemmenden TdR in die S-Phase über (Jackman & O'Connor, 1998).

Die Zellen, welche am Vortag in Gewebekulturschalen eingesät wurden, sollten eine Dichte von 60-70% erreicht haben. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium versorgt, dem TdR in einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt war. Nach einer sechzehnständigen Inkubation erfolgte das Entlassen der Zellen aus dem ersten TdR-Block. Dazu wurde das Medium abgesaugt und zweimal für fünf Minuten mit frischem Medium gewaschen. Die Zellen wurden nun für zehn Stunden in TdR-freiem Medium inkubiert. Der zweite TdR-Block erfolgte analog dem Ersten für weitere sechzehn Stunden. Das Entlassen der Zellen wurde genau wie oben beschrieben durchgeführt. Im Rhythmus von drei Stunden nach dem Entlassen wurden die Zellen geerntet (Abschnitte 2.2 und 2.11), welche nun ausgehend vom G₁-/S-Übergang die nachfolgenden Zellzyklusphasen mit hoher Synchronität durchlaufen. Unbehandelte Zellen und die 0h-Probe wurden sofort nach dem zweiten Entlassen geerntet. Danach wurden Ganzzellextrakte präpariert (Abschnitt 2.13) sowie SDS-PAGE und Western-Blot (Abschnitte 2.17 und 2.19) durchgeführt. Für die Immunfluoreszenz wurden parallel Zellen auf Objektträgern synchronisiert und für mikroskopische Studien vorbereitet (Abschnitt 2.12).

Thymidin-Stammlösung: 200 mM TdR in 1x PBS

2.4.2 Synchronisation in der G₀-Phase

Serumentzug durch Reduktion des Anteils an Serum im Kulturmedium in Kombination mit Kontaktinhibition ist eine häufig eingesetzte Methode, um Zellen in der G₀-Phase reversibel zu arretieren (Davis et al., 2001; Merrill, 1998).

T98G-Zellen und humane embryonale Fibroblasten (HEF) wuchsen in Gewebekulturflaschen bis zu einer 70%igen Konfluenz. Das verbrauchte Medium wurde vollständig abgesaugt und durch 50 ml neues Medium, supplementiert mit 0,5% (v/v) FCS, ersetzt. In diesem Mitogenmangel-Medium erfolgte die Inkubation der Zellen für bis zu 20 Tage. Die Zellen wurden nun je nach Versuchsabsicht nach 1, 3, 5, 7, 15 bzw. 20 Tagen Serumentzug geerntet (Abschnitte 2.2 und 2.11), Ganzzellextrakte präpariert (Abschnitt 2.13) sowie SDS-PAGE und Western-Blot (Abschnitte 2.17 und 2.19) durchgeführt.

Für Serumstimulationsexperimente wurden die Zellen für 10 Tage unter Serumentzugsbedingungen gehalten und dann 1:3 oder 1:4 in frisches Medium mit 10 % (v/v) FCS gesplittet, um sie zu definierten Zeiten nach erfolgter Rückkehr in den Zellzyklus zu ernten. Für die Immunfluoreszenz wurden parallel Zellen auf Objektträgern synchronisiert und für mikroskopische Studien verwendet (Abschnitt 2.12).

2.5 Induktion und Nachweis der Seneszenz

Bei den Zelllinien WI-38 und MRC-5 handelt es sich um primäre embryonale Fibroblasten, die nach einer kritischen Zahl von Populationsverdopplungen bzw. Passagen ihre Teilung einstellen und in die Seneszenz übergehen.

Experimentell wurde der Übergang in die replikative Seneszenz durch kontinuierliche Kultivierung der Fibroblasten erreicht. Dazu wurden die Zellen bei noch vorhandener Teilungsaktivität entsprechend 1:2 bis 1:4 subkultiviert bzw. nach eingestellter Teilung alle zwei Tage mit frischem Medium versorgt. Nach Ernte der Zellen (Abschnitt 2.2) folgte die Präparation von Ganzzellextrakten (Abschnitt 2.13) sowie SDS-PAGE und Western-Blot (Abschnitte 2.17 und 2.19).

Als Seneszenzmarker wurde unter anderem die Aktivität der *senescence associated β -galactosidase* (SA β -Gal) bestimmt (Dimri et al., 1995). Es ist bekannt, dass diese lysosomale Hydrolase ausschließlich in seneszenten Zellen aktiv ist und die Spaltung von X-Gal der Färbelösung bei pH 6.0 katalysiert. Zunächst wurden Zellen auf beschichteten Objektträgern ausgesät, zweimal mit 1x PBS gewaschen und fünf Minuten bei Raumtemperatur in 2% para-Formaldehyd in 1x PBS inkubiert. Zur Entfernung von Formaldehyd-Resten schlossen sich zwei erneute Waschschriffe mit 1x PBS an. Nun wurde der Objektträger in der frisch bereiteten SA- β -Gal-Färbelösung platziert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Entnahme des Objektträgers. Nachdem das Mounting-Medium appliziert und ein Deckgläschen aufgelegt worden war, konnte der Objektträger mit farblosem Nagellack versiegelt werden. Die Anzahl ungefärbter bzw. blau gefärbter seneszenten Zellen wurde anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt.

SA- β -Gal-Färbelösung:

- 1 mg/ml (w/v) X-Gal in DMF
- 40 mM Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer pH 6,0
- 5 mM K₃Fe(CN)₆
- 5 mM K₄Fe(CN)₆
- 150 mM NaCl
- 2 mM MgCl₂

2.6 Induktion und Nachweis der terminalen Differenzierung

Die humanen Leukämie-Zelllinien HL60 und K562 dienen als Modellsysteme für die Induktion der terminalen Differenzierung. Als Differenzierungsmittel wurde Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) eingesetzt, welches im Falle der HL60-Zellen zum Monozyten/Makrophagen- (Huberman & Callahan, 1979; Rovera et al., 1979) und bei Verwendung der K562-Zellen zum Megakaryozyten-Phänotyp (Whalen et al., 1997) führte. PMA zählt zu den Phorbolen, welche wiederum polyzyklische Alkoholderivate des Crotonöls sind.

Eine 160 µM PMA-Stammlösung wurde in DMSO hergestellt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. HL60- und K562-Zellen wurden zur Induktion der terminalen Differenzierung für bis zu 96h mit 16 nM PMA versetzt (Iwata et al., 2003; Kaneki et al., 1999; Olins et al., 2000). Entsprechende Kontrollkulturen erhielten die äquivalente Menge des Lösungsmittels DMSO (0,01%). Adhärente Zellen wurden mechanisch mittels eines Zellschabers vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und mit der in Suspension wachsenden Zellpopulation vereinigt. Nach der Zellernte (Abschnitt 2.2) erfolgte die Präparation von Ganzzellextrakten (Abschnitt 2.13) sowie SDS-PAGE und Western-Blot (Abschnitte 2.17 und 2.19).

Parallel wurden HL60-Zellen auf Objektträgern immobilisiert (Abschnitt 2.12.1), mit PMA stimuliert und für den kolorimetrischen Nitroblau-tetrazolium (NBT)-Differenzierungstest (Breitman et al., 1980) verwendet. Eine NBT-Stammlösung von 6 mg/ml wurde in Medium angesetzt und die Zellen mit 1 mg/ml dieser Lösung für dreißig Minuten bei 30°C inkubiert (Zhou et al., 2001). Nachdem die Objektträger getrocknet waren, konnte der Anteil an NBT-positiven Zellen, d.h. Zellen, die zytoplasmatisch blau-schwarze Diformazan-Präzipitate enthielten, mikroskopisch ausgezählt werden.

2.7 Inhibition der lysosomalen und proteasomalen Proteindegradation

Eine Stunde vor Zugabe des Differenzierungsmittels PMA wurden HL60-Zellen mit 10 µM MG-132 (Biomol; Stammlösung 10 mM in DMSO) oder 10 µM Lactacystin (Biomol; Stammlösung 10 mM in DMSO) oder 20 mM NH₄Cl (Sigma; Stammlösung 100 mM in DMEM) und 100 µM Leupeptin (Biomol; Stammlösung 1 mM in DMEM) versetzt. Die nachfolgende Durchführung war analog dem Abschnitt 2.6.

2.8 Apoptoseinduktion

Die Auslösung der Apoptose erfolgte in verschiedenen humanen Zelllinien durch diverse Stimuli (Tabelle 5). Die Zellen wurden zu definierten Zeitpunkten nach Apoptose-Induktion geerntet (Abschnitte 2.2 und 2.11), Ganzzellextrakte präpariert (Abschnitt 2.13) sowie SDS-PAGE und Western-Blot (Abschnitte 2.17 und 2.19) durchgeführt.

Zelllinie	Induktion der Apoptose	Stammlösungen	Gerät/Bezugsquelle
BT-20	UV-C-Exposition 200 J/m ²		UV-Stratalinker 254 nm
HeLa S3	UV-C-Exposition 150 J/m ²		UV-Stratalinker 254 nm
HeLa S3	100 ng/ml Tumor-Nekrose-Faktor α 5 µg/ml (w/v) Cycloheximid	100 µg/ml in H ₂ O _{dist.} 5 mg/ml (w/v) in H ₂ O _{dist.}	Biomol Sigma
CEM	1 µg/ml (v/v) anti-Fas-Antikörper	100 µg/ml	Merck Bioscience

Tabelle 5: Induktion der Apoptose in humanen Zelllinien

2.9 Bestimmung der Protein-Halbwertszeit

Um die Regulation von Replikationsfaktoren im Zellzyklus besser zu verstehen, ist die Bestimmung der Halbwertszeit des Proteins wichtig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt.

2.9.1 Cycloheximid-Inkubation

Cycloheximid (CHX) ist ein Antibiotikum, welches von *Streptomyces griseus*-Arten produziert wird. Auf molekularer Ebene inhibiert es die Translation der mRNA durch Interaktion mit dem 80S-Ribosom (Setkov et al., 1992; Suzuki et al., 1992).

Logarithmisch wachsende HeLa S3- und T98G-Zellen wurden in Gewebekulturflaschen gehalten und zur Inhibierung der Proteinneusynthese mit 50 µg/ml Cycloheximid-Lösung versetzt. Die Ernte der so behandelten Zellen erfolgte im sechsstündigen Rhythmus (Abschnitt 2.2). Die Analyse der Halbwertszeit des humanen Cdc45-Proteins wurde dann mittels SDS-PAGE, Western-Blot und anschließender Immundetektion durchgeführt (Abschnitte 2.17 und 2.19). Die erhaltenen Cdc45-Signale konnten mit dem Programm Phoretix 1D Advance (Nonlinear Dynamics Limited) ausgewertet werden.

Cycloheximid-Stammlösung: 20 mg/ml (w/v) Cycloheximid in H₂O_{dist.}

2.9.2 Metabolische Markierung mit [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein

Bei der metabolischen Markierung von neusynthetisierten Proteinen werden die Zellen in Medium kultiviert, welches alle essentiellen Komponenten für das Zellwachstum enthält, wobei ein oder zwei Aminosäuren durch ihre radioaktiv markierten Pendants substituiert wurden (Bonifacino, 1998).

HeLa S3-Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden in Gewebekulturschalen gehalten. Bevor die Markierung mit radioaktiven Aminosäuren erfolgen konnte, mussten die Zellen für eine Stunde in einem Cystein-Methionin-freien Medium (Gibco) supplementiert mit 10% (v/v) FCS inkubieren werden. Danach wurden 5 ml frisches Medium und 500 µCi Pro-MixTM (Amersham Bioscience), welcher die [³⁵S]-markierten Aminosäuren Cystein und Methionin enthielt, je Gewebekulturschale zugegeben und für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieser *pulse*-Periode werden die exogen zugeführten, radioaktiv markierten Aminosäuren in alle neusynthetisierten Proteine eingebaut. Das radioaktive Medium wurde nun entfernt und der Zellrasen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Die 0h-Probe konnte sofort geerntet werden, die restlichen Proben erhielten frisches Medium, dem 5 mM L-Methionin und 5 mM L-Cystein (Sigma) zugesetzt war und wurden für 12h bis 60h weiter bei 37°C inkubiert. In dieser so genannten *chase*-Periode werden die im Überschuss vorliegenden, nicht-markierten Aminosäuren Cystein und Methionin in die neu entstehenden Proteine eingebaut (Zhou, 2004). Die Ernte der Zellen sowie die Herstellung von Ganzzelextrakten wurden in den Abschnitten 2.2 und 2.13 beschrieben. Die Bestimmung der Halbwertszeit des humanen Cdc45-Proteins erfolgte durch Messung der Radioaktivität, nachdem eine Cdc45-Immunpräzipitation mit 1 mg Rohextrakt (Abschnitt 2.16), SDS-PAGE und Western-Blot (Abschnitte 2.17 und 2.19) ausgeführt wurden. Ein KodakBioMax MR-Film wurde für mehrere Stunden oder über Nacht exponiert, um das radioaktiv markierte Cdc45-Protein zu

detektieren. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mit dem Programm Phoretix 1D Advanced (Nonlinear Dynamics Limited).

2.10 Expression und Reinigung von rekombinantem Cdc45

Der Vektor pFastBac[™] HTb, welcher die humane CDC45-cDNA enthielt, wurde uns freundlicherweise von I. Kukimoto zur Verfügung gestellt (Kukimoto et al., 1999). Es wurde ein Baculovirus-Expressionsvektor konstruiert (J. Fuchs, FLI Jena), der zur Überexpression des humanen His₆-Cdc45-Proteins in High Five[™]-Insektenzellen (Invitrogen) genutzt wurde.

Die Insektenzellen wuchsen bei 27°C in Flaschen mit einer Kulturoberfläche von 500 cm² in TC-100-Medium (Cambrex BioScience) supplementiert mit 10% FCS (v/v) (PAA Laboratories GmbH). Je Kulturflasche wurde 800 µl Baculovirus-Überstand zugegeben und achtundvierzig Stunden zur Expression des Proteins bei 27°C inkubiert. Zehn dieser beschriebenen Ansätze waren für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins notwendig. Nachdem die Zellen durch vorsichtiges Schlagen gegen die Handkante vom Boden der Flaschen abgelöst waren, wurde die Zellsuspension in 250 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 220 xg 2 min und 4°C zentrifugiert (Hettich, Rotana 46RC). Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass überexprimiertes humanes Cdc45-Protein in High Five[™]-Insektenzellen vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert war (Abbildung 23B). Deshalb wurde nur der Zytoplasmaextrakt zur weiteren Aufreinigung verwendet.

Zur Herstellung der zytoplasmatischen Extrakte wurde Puffer A auf das Zellsediment gegeben und für fünfzehn Sekunden gemixt. Danach folgte ein Inkubationsschritt für zehn Minuten auf Eis. Es wurde erneut fünf Sekunden gemixt, 5 min bei 15000 xg und 4°C zentrifugiert und anschließend der Zytoplasmaextrakt abgenommen.

Die Aufreinigung des aminoterminal mit sechs Histidin-Resten versehenen Cdc45 konnte nun über eine Cobalt-Talon[™]-Matrix (Clontech) erfolgen. Dazu wurden 2 ml Talon[™]-Material mit Waschpuffer 1 äquilibriert und anschließend der Zytoplasmaextrakt hinzugegeben. Die Anbindung des His₆-Cdc45-Proteins an die Talon[™]-Matrix geschah innerhalb einer Stunde unter ständigem Invertieren bei 4°C. Nachfolgend wurde dreimal mit Waschpuffer 2 gewaschen und das Talon[™] in eine Econo-Säule überführt. Nun schlossen sich wieder zwei Waschschrte mit Waschpuffer 3 und 4 an. Die Elution des Proteins von der Affinitätsmatrix erfolgte in zehn Schritten mit je 500 µl Elutionspuffer. Die Proben wurden über Nacht dialysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Puffer A:

- 10 mM HEPES pH 7,9
- 1,5 mM MgCl₂
- 10 mM KCl
- 0,5 mM DDT
- 0,2 mM PMSF
- 2 µg/ml Pepstatin
- 5 µg/ml Leupeptin

Das DTT und die Protease-Inhibitoren wurden unmittelbar vor dem Zellaufschluss dem Puffer zugefügt.

Waschpuffer 1:

- 50 mM Tris/HCl pH 8,0
- 250 mM NaCl
- 3 mM 2-Mercaptoethanol

Waschpuffer 2:

- Zusammensetzung Waschpuffer 1
- 1% (v/v) Triton[®]-X-100

Waschpuffer 3:	10 mM Imidazol 150 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 mM 2-Mercaptoethanol	Waschpuffer 4:	20 mM Imidazol 150 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 mM 2-Mercaptoethanol
Elutionspuffer:	350 mM Imidazol 150 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 mM 2-Mercaptoethanol	Dialysepuffer:	30 mM KPi pH 7,8 1 mM EDTA 5 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 5 mM 2-Mercaptoethanol 50% (v/v) Glycerin

2.11 Durchflusszytometrische Analyse

Die Bestimmung der Verteilung einer Zellpopulation in verschiedenen Zellzyklusphasen sowie die Detektion hypodiploider/subG₁-Zellen als spätes Apoptose-Charakteristikum ist mit Hilfe der Durchflusszytometrie möglich. Dabei werden fluoreszenzmarkierte Zellen in einer Trägerflüssigkeit an einem Laser vorbeigeführt. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist abhängig vom DNA-Gehalt und somit von der Zellzyklusphase der Zellen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden nach der Ernte zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und in 0,5 ml 1x PBS resuspendiert. Unter Schütteln wurde tropfenweise 3 ml 99,9%iger Ethanol zur Fixierung der vereinzelter Zellen zugegeben. Nach einer minimalen Inkubationszeit von fünfzehn Minuten bei 4°C erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 500 xg (Zentrifuge Hettich Rotina 48R). Das Zellsediment wurde nun zweimal mit 1x PBS gewaschen, anschließend in 0,5 ml einer frisch bereiteten Propidiumjodid/RNase A-Lösung aufgenommen und dreißig Minuten abgedunkelt bei 37°C inkubiert. Zur Festlegung der G₁-, S- und G₂/M-Grenzen wurden die entsprechenden unbehandelten Zellen eingesetzt. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer EPICS XL-MCL (Beckman/Coulter). Zur Datenauswertung wurde die Software WinMDI[®] verwendet.

50x Propidiumjodid-Lösung:	2 mg/ml (w/v) Propidiumjodid in 38 mM NaCitrat-Puffer pH 7,0
400x RNase A-Lösung:	100 mg/ml (w/v) RNase A
Propidiumjodid/RNase A-Lösung:	40 µg/ml (w/v) Propidiumjodid 250 µg/ml (w/v) RNase A in 1x PBS pH 7,4

2.12 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie ist es möglich, die subzelluläre Lokalisation eines Zielproteins in Zellen unterschiedlicher Zellzyklusstadien zu bestimmen.

2.12.1 Aufbringen der Zellen auf Objektträger und BrdU-Markierung

Adhärenente Zellen wuchsen auf beschichteten Objektträgern, die in Zellkulturschalen oder quadriPerm-Schalen (Vivascience) in Medium platziert waren. Nachdem die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht hatten, folgte die Fixierung und Permeabilisierung mit para-Formaldehyd und TritonX[®]-100 ([Abschnitt 2.12.2](#)).

Zum Nachweis der S-Phase, d.h. aktiver DNA-Replikation, wurde eine *pulse*-Markierung mit 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin (BrdU) vorgenommen. BrdU ist ein halogeniertes Thymidin-Analogen, welches gut zellgängig ist und während der Neusynthese in naszierende DNA eingebaut wird.

Die Markierung erfolgte mit 32 μM BrdU in Zellkulturmedium für fünfzehn oder dreißig Minuten. Danach wurden die Zellen, zur Entfernung von nichteingebautem BrdU, zweimal in frischem Medium gewaschen. Nun konnte auch hier im Anschluss die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgen (Abschnitt 2.12.2).

BrdU-Stammlösung: 3,2 mM BrdU in 1x PBS

Suspensionszellen wurden entweder auf Poly-L-Lysin präparierten Objektträgern aufgebracht oder durch Zytozentrifugation auf Objektträgern immobilisiert, um dann im Folgenden fixiert und permeabilisiert zu werden.

In jede Vertiefung der Objektträger wurde 20 μl der Poly-L-Lysin-Lösung (Sigma) aufgetropft und nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten wieder entfernt. Nach vollständigem Trocknen der Objektträger konnte nun die Zellsuspension aufgebracht werden. Ein Großteil der Suspensionszellen zeigte eine Adhärenz nach zehn bis dreißig Minuten.

In einigen Fällen kam die Zytozentrifugationsmethode zur Immobilisierung von Zellen auf Objektträgern zum Einsatz. Hierbei wurde eine Zytozentrifuge (Thermo Electron Corporation) und Super-Frost®Plus-Objektträger (Roth) eingesetzt.

Poly-L-Lysin-Lösung: 10% (v/v) Poly-L-Lysin-Stammlösung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{ddest.}}$

2.12.2 Fixierung- und Permeabilisierung

Die Fixierung der Zellen auf den Objektträgern erfolgte mit 4% para-Formaldehyd in 1x PBS für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Para-Formaldehyd kann aufgrund seines geringen Molekulargewichtes gut in die Zellen eindringen und so zur Quervernetzung von intrazellulären Proteinen führen. Das nachzuweisende Antigen wird an seinem Wirkungsort fixiert. Ferner werden die Epitope durch diese Fixierungsmethode sehr gut erhalten. Die Objektträger wurden nun dreimal mit 1x PBS für zwei Minuten gewaschen. Im Anschluss folgte eine Inkubation für zwei Minuten bei Raumtemperatur mit 0,25% TritonX®-100 in 1x PBS. TritonX®-100 ist ein nicht-ionisches Detergens, welches die Permeabilisierung der Membranen bewirkte und damit die nachfolgenden Antikörper-Applikationen ermöglichte. Zwei weitere Waschprozesse mit 1x PBS schlossen sich an. Die Objektträger konnten nun bis zur Immundetektion in 1x PBS bei 4°C aufbewahrt werden.

2.12.3 DNA-Denaturierung

Zur Detektion des inkorporierten BrdU muss die Zugänglichkeit der BrdU-spezifischen Antikörper gewährleistet werden. Hierzu wurden die fixierten Zellen mit 1N HCl für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte durch Spülen mit 1x PBS neutralisiert werden.

2.12.4 Immundetektion durch indirekte Immunfluoreszenz

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde über Nacht bei 4°C ein BSA-haltiger Blockierungspuffer in die Objektträgervertiefungen appliziert. Am darauf folgenden Tag schloss sich die Inkubation mit den primären bzw. sekundären Antikörpern für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur an (Tabellen 6 und 7). Zur Markierung der DNA wurde dreißig

Sekunden mit 0,5 µg/ml DAPI-Lösung inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend getrocknet und ein kleiner Tropfen *Mounting*-Puffer in jede Vertiefung aufgetragen. Nach Aufbringen eines Deckglases konnten die Ränder der Objektträger mit Nagellack versiegelt werden.

Blockierungspuffer:	5% BSA (w/v) in 1x PBS
Antikörper-Verdünnungspuffer:	0,5% BSA (w/v) + 0,1% (v/v) Triton®X-100 in 1x PBS
DAPI-Stammlösung:	1 mg/ml (w/v) DAPI in 1x PBS
<i>Mounting</i> -Puffer:	223 mg 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]-Oktan 0,8 ml H ₂ O _{dist.} 0,2 ml 1M Tris/HCl pH 8,0 9,0 ml Glycerin

2.13 Präparation von Ganzzellextrakten

Bei der Herstellung von Ganzzellextrakten wurde zum Zellsediment das gleiche Volumen an eiskaltem Lysepuffer zugegeben, das dem Volumen des Zellsedimentes entsprach. Durch mehrfaches, schnelles Ziehen des Reaktionsgefäßes über einen Eppendorfständer konnten die Zellen durch auftretende Scherkräfte zusätzlich auch mechanisch aufgeschlossen werden. Die Proben wurden für dreißig Minuten auf Eis inkubiert, wobei alle zehn Minuten die Suspension gemixt wurde. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 16000 xg und 4°C (Sigma 3K30) konnte der Überstand, der den Ganzzellextrakt darstellt, vollständig abgenommen und bei -20°C bzw. -80°C gelagert werden.

Lysepuffer:	1x TBS (137 mM NaCl) 1% (v/v) Nonidet® P40 363 mM NaCl 1 µg/ml Aprotinin 50 nM Leupeptin 1 mM PMSF
-------------	---

Die Protease-Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin und PMSF wurden unmittelbar vor dem Zellaufschluss dem Lysepuffer zugefügt.

2.14 Präparation von fraktionierten Zellextrakten

Quieszente T98G-Zellen ([Abschnitt 2.4.2](#)) wurden mit 40 J/m² UV-C-Strahlung exponiert, um die *nucleotide-excisions-repair* (NER) zu induzieren. Zu definierten Zeitpunkten nach Bestrahlung erfolgte die Zellernte ([Abschnitt 2.2](#)) sowie die Herstellung der fraktionierten Rohextrakte ([Balajee & Geard, 2001](#); [Prosperi et al., 1993](#)).

Das Zellsediment wurde in Puffer I resuspendiert, fünfzehn Sekunden gemixt und für acht Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 1500 xg, 5 min und 4°C (Sigma 3K30) zur Gewinnung der Detergenz-löslichen Proteine. Das verbleibende Sediment wurde einmal mit Puffer I gewaschen und dann mit Puffer II vermischt, drei Minuten mit Ultraschall behandelt und anschließend für zwanzig Minuten auf Eis inkubiert. Die vom Chromatin gelösten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 16000 xg für 5 min bei 4°C (Sigma 3K3) gewonnen. Die fraktionierten Rohextrakte konnten bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

Puffer I:	10 mM Tris/HCl pH 7,4 2,5 mM MgCl ₂ 0,5% (v/v) Nonidet® P40 5 µg/ml Aprotinin 5 µg/ml Leupeptin 0,2 mM PMSF	Puffer II:	25 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,4 0,5 M NaCl 1 mM EDTA 0,5% (v/v) Triton® 10% (v/v) Glycerol 5 mM MgCl ₂ 5 µg/ml Aprotinin 5 µg/ml Leupeptin 0,2 mM PMSF
-----------	---	------------	---

Die Protease-Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin und PMSF wurden unmittelbar vor dem Zellaufschluss den Puffern zugefügt.

2.15 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mittels der von Bradford entwickelten Methode (Bradford, 1976). Zunächst wurde photometrisch die Extinktion von Verdünnungen einer *bovine serum albumine* (BSA)-Stammlösung ermittelt und eine Standardkurve erstellt. Alle zu messenden Proben wurden 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und 2 µl davon für die Proteinbestimmung eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens fünf Minuten konnte die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt werden. Mittels der Standardkurve wurden dann die erhaltenen Extinktionen in Konzentrationen umgerechnet.

2.16 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) wurde in dieser Arbeit angewendet, um mögliche posttranslationale Cdc45-Modifikationen nachzuweisen. Ferner erfolgte im Anschluss an die radioaktive Markierung neusynthetisierter Proteine in HeLa S3-Zellen (Abschnitt 2.9.2) die Isolation des humanen Cdc45 mit Hilfe der Immunpräzipitation, um durch Autoradiographie die Halbwertszeit des Proteins zu bestimmen.

Als Matrix kam Protein-G-Sepharose (PGS) zum Einsatz (Amersham Bioscience). Pro Reaktionsansatz wurden 100 µl einer äquilibrierten 10%igen (v/v) PGS-Suspension verwendet. Alle Zentrifugationen wurden bei 5900 xg für 2 min und 4°C (Sigma 3K30) durchgeführt. Zunächst folgte ein zweimaliges Waschen der PGS mit 500 µl IP-Puffer. Anschließend wurden die spezifischen Antikörper zum PGS-Sediment zugegeben (Tabellen 6 und 7) und das Volumen mit IP-Puffer auf 500 µl ergänzt. Die Anbindung der Antikörper an Protein-G erfolgte nun dreißig Minuten bei 4°C unter ständigem Invertieren der Reaktionsgefäße. Die PGS wurde einmal mit 500 µl IP-Puffer gewaschen. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wurde dann die PGS mit 3% Perfekt-Block (MoBiTec) in IP-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein erneutes Waschen mit IP-Puffer. Anschließend wurde 1 mg der Ganzzellextrakte in 500 µl IP-Puffer auf die äquilibrierte und blockierte PGS gegeben und dreißig Minuten inkubiert. Nach diesem *preclearing*-Schritt, der eine Reduktion von unspezifischen Proteinbindungen bewirken sollte, wurde der Ganzzellextrakt dann auf frische äquilibrierte und blockierte PGS gegeben und zwei Stunden unter Invertieren der Reaktionsgefäße bei 4°C inkubiert. Danach wurde viermal mit IP-Puffer gewaschen. Nach der finalen Zentrifugation wurde zum PGS-Sediment 10 µl 4x SDS-Auftragspuffer zugefügt und die Probe für fünf Minuten bei 95°C gekocht. Dadurch trennten sich die IP-Antikörper vom Protein-G, die Antigene von den IP-Antikörpern und nicht zuletzt konnten auch die schweren und leichten Ketten der Antikörper reduziert werden. Die Detektion des Cdc45-Proteins

erfolgte durch SDS-PAGE und Western-Blot (Abschnitte 2.17 und 2.19) bzw. im Falle von radioaktiver Markierung durch Autoradiographie (Abschnitt 2.9.2).

IP-Puffer: 50 mM HEPES pH 7,5
150 mM NaCl
0,5% (v/v) Nonidet® P40

2.17 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde angewendet, um Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen (Laemmli, 1970). Dazu wurden 1 mm dicke Polyacrylamidgele unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Die Proben wurden für fünf Minuten in 4x SDS-Auftragspuffer bei 95°C gekocht. Nach Beladung der Gele mit den denaturierten Proben und dem vorgefärbten Molmassenmarker erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 25 mA je Gel.

vorgefärbter Molmassenmarker: SD-7B (Sigma)
SM0671 Page Ruler™ prestained protein ladder (Fermentas Life Science)

Lösung A:	30% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid	1x SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Lösung B:	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS	4x SDS-Auftragspuffer:	180 mM Tris/HCl pH 6,8 3% (w/v) SDS 3% (v/v) β-Mercaptoethanol 40% (v/v) Glycerin 0,002% (w/v) Bromphenolblau
Lösung C:	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS		

Sammelgel (angegebene Menge für jeweils 2 Minigele)

	Lösung A	Lösung C	H ₂ O	10% (w/v) APS	TEMED
	1,65 ml	2,5 ml	5,85 ml	50 µl	10 µl

Trenngel (angegebene Menge für jeweils 2 Minigele)

	Lösung A	Lösung B	H ₂ O	10% (w/v) APS	TEMED
7,5%	3 ml	3 ml	5,88 ml	120 µl	5 µl
10%	4 ml	3 ml	4,88 ml	120 µl	5 µl
12,5%	5 ml	3 ml	3,88 ml	120 µl	5 µl

2.18 Kolloidale Coomassie-Färbung

Die kolloidale Coomassie-Färbung erlaubt den Nachweis sehr geringer Proteinmengen im Gel und erreicht annähernd die Sensitivität einer Silberfärbung. Die Polyacrylamidgele wurden laut Herstellerangaben mit Färbelösung inkubiert.

PageBlue™ protein staining solution (Fermentas Life Science)

Molmassenmarker: 10747-012 BenchMark™ protein ladder (Invitrogen)

2.19 Western-Blot und Immundetektion

Zur Immobilisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Polyvinylidenfluorid-Membranen (PVDF-Membranen; Millipore) wurde das Nass-Elektroblot-Verfahren angewendet. Zunächst erfolgte eine kurze Inkubation der PVDF-Membran in Ethanol_{abs.} und anschließend in H₂O, bevor die Membran für fünf Minuten in 1x Transferpuffer äquilibriert

wurde. Die zusammengebaute Blotanordnung wurde so in der Apparatur platziert, dass die Membran auf der Anoden-Seite orientiert war. Nach einer Transferzeit von neunzig Minuten bei 150 mM je Apparatur erfolgte die Inkubation der Membran für dreißig Minuten in 5% (w/v) Magermilchpulver (Saliter) in 1x TBST, um unspezifische Bindestellen zu blockieren.

1x Transferpuffer: 100 mM NaHCO₃
 30 mM Na₂CO₃

Die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Der sekundäre enzymgekoppelte Antikörper wurde nach dreimaligem Waschen der Membran in 1x TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Tabellen 6 und 7). Anschließend folgte ein wiederholtes Waschen der Membran in 1x TBST. Die Detektion der immobilisierten Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte nun durch katalysierte Reaktionen der Enzyme, die mit den sekundären Antikörpern konjugiert waren.

Bei *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörpern erfolgte der Nachweis durch die sensitive *enhanced chemoluminescence reaction* (ECL). Hierbei kommt es unter alkalischen Bedingungen zur Peroxidase-katalysierten Oxidation des Diazylhydrazids Luminol, welches im angeregten Zustand Licht emittiert, das über einen Film als Schwärzung nachgewiesen wird. Zunächst mussten zwei Lösungen hergestellt werden, die separiert einerseits das Substrat Luminol und den Enhancer para-Coumarsäure, andererseits das Oxidationsmittel H₂O₂ enthielten. Diese Lösungen wurden unmittelbar vor der Detektion vereinigt und die Membran eine Minute darin inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Folien platziert und die Expositionszeit der darauf gelegten Filme je nach Signalstärke variiert. Die KodakBioMax MR-Filme wurden nun eine Minute in ein Entwickler-Bad getaucht und eine Minute in Fixierer-Lösung inkubiert, bevor sie mit Wasser gründlich gewaschen, getrocknet und durch Scannen dokumentiert werden konnten.

ECL-Lösung 1:	100 mM Tris/HCl pH 8,5 2,5 mM Luminol 400 µM para-Coumarsäure	ECL-Lösung 2:	5,4 mM H ₂ O ₂ 100 mM Tris/HCl pH 8,5
---------------	---	---------------	--

Entwickler- und Fixierer-Lösungen: AGFA-Developer G153A/B (Röntgendiagnostik Fischer, Werter)
 AGFA-Rapid Fixer G354 (Röntgendiagnostik Fischer, Werter)

Bei *alkaline phosphatase* (AP)-Konjugaten kam die kolorimetrische Nitroblau-tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (NBT/BCIP)-Farbreaktion zur Detektion der Zielproteine zum Einsatz. Hierbei wurde die PVDF-Membran in 20 ml AP-Puffer inkubiert, dem 132 µl NBT und 66 µl BCIP zugesetzt waren. In einem abgedunkelten Reaktionsgefäß wurde die Membran solange geschwenkt, bis blau-schwarze Banden erschienen. Anschließend konnte die Reaktion mit Wasser abgestoppt werden.

NBT-Lösung:	50 mg/ml (w/v) NBT in 70% DMF	BCIP-Lösung:	50 mg/ml (w/v) BCIP in 100% DMF
AP-Puffer:	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 100 mM Tris/HCl pH 8,5		

2.20 Immunhistochemie

Umfangreiche Experimente belegten bislang die sehr gute Verwendbarkeit des laboreigenen, monoklonalen Cdc45-spezifischen Antikörpers C45-3G10 für Immundetektion, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz (Bauerschmidt et al., 2007; Pollok et al., 2003) sowie für Chromatin-Immunpräzipitation (Liu et al., 2006). Darüber hinaus bestand großes Interesse an der Evaluierung der Einsetzbarkeit des Antikörpers in der Immunhistochemie. Die immunhistochemischen Färbungen an Gewebeschnitten wurden von Dr. Jörg Säger (Pathologie Bad Berka) ausgeführt.

Die immunhistochemische Detektion erfolgte, mit kleinen Modifikationen, entsprechend der von Hsu und Mitarbeitern (Hsu et al., 1981) beschriebenen *avidin biotin complex*-Methode. Dazu wurden 4 mm dicke Paraffin-Schnitte auf Objektträger transferiert und über Nacht getrocknet. Nach De-Paraffinierung und Re-Hydration wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation mit 0,5% H₂O₂ für dreißig Minuten inaktiviert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Serum für zwanzig Minuten blockiert. Zur Demaskierung des Antigens erfolgte dann die Überführung der Schnitte in Citrat-Puffer, und anschließend wurde für sechzehn Minuten in der Mikrowelle bei 640 Watt inkubiert. Es schloss sich eine dreiminütige Proteinase K-Behandlung an. Nachfolgend wurde mit primären und sekundären Antikörpern inkubiert (Tabellen 6 und 7). Dazu wurde der primäre Antikörper zwölf Stunden bei 4°C appliziert. Nach mehrmaligem Waschen mit 1x PBS folgte die Inkubation mit dem sekundären biotinylierten Antikörper für dreißig Minuten bei Raumtemperatur. Es wurde wiederum mehrfach mit 1x PBS gewaschen und dreißig Minuten mit einem vorassemblierten Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase (Vector) inkubiert. Zur Darstellung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte die Behandlung der Schnitte für fünf Minuten bei 25°C mit einer 3-3'-Diaminobenzamidin-Färbelösung. Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin für fünf Minuten wurde mit Ethanol dehydriert. Auf die Objektträger wurde abschließend Xylen aufgetragen und mit Canada-Balsam versiegelt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem Olympus BH-2-Mikroskop.

Citrat-Puffer:	0,01 M pH 6,0
Proteinase K-Lösung:	1 mg/ml in 0,05 M Tris/HCl pH 7,5
Antikörper-Lösung:	0,05 M 1x PBS pH 7,5 1% (v/v) BSA (primäre Aks) / 0,1% (v/v) BSA (sekundäre Aks)
Färbelösung:	1,5 µM 3,3'-Diaminobenzamidin 10 mM H ₂ O ₂ 0,05 M TBS pH 7,6

2.21 Antikörper

Die für Immundetektion, Immunpräzipitation, Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und Apoptose-Induktion verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in den Tabellen 6 und 7 näher beschrieben.

Für die Immundetektion wurde die entsprechende Antikörper-Lösung in der angegebenen Verdünnung in 1x TBST mit 5% (v/v) FCS angesetzt. Zusätzlich enthielt die Antikörper-Lösung 0,05% (w/v) Natriumazid oder im Falle von HRP-konjugierten Antikörpern 0,01% (w/v) Thimerosal, um das Wachstum von Mikroorganismen zu unterdrücken.

Die Antikörper für Immunfluoreszenz-Experimente wurden in Antikörper-Verdünnungspuffer aufgenommen (Abschnitt 2.12.4).

Natriumazid-Stammlösung: 10% (w/v) Natriumazid in $\text{H}_2\text{O}_{\text{ddist.}}$

Thimerosal-Stammlösung: 10% (w/v) Thimerosal in 1x TBS

Antikörper	Antigen	Art	Verwendung	Referenzen
C45-3G10	humanes Cdc45	monoklonaler Ratten-Ak (Hybridoma-Überstand)	1:10 IB 1:5 IF 100 µl IP 1:10 IHC	Dr. E. Kremmer (GSF, München, Germany)
sc-20685	humanes Cdc45	polyklonaler Kaninchen-Ak	1:20 IF	Santa Cruz (USA)
M055-3S	humanes Orc2	monoklonaler Maus-Ak	1:400 IB	MoBiTec (Germany)
sc-13136	humanes Cdc6	monoklonaler Maus-Ak	1:250 IB	Santa Cruz (USA)
Clone 46	humanes Mcm2	monoklonaler Maus-Ak	1:1000 IB	BD Bioscience (Belgien)
sc-22779	humanes Mcm4	polyklonaler Kaninchen-Ak	1:500 IB	Santa Cruz (USA)
sc-9966	humanes Mcm7	monoklonaler Maus-Ak	1:1000 IB	Santa Cruz (USA)
ab3733	humanes Mcm10	polyklonaler Kaninchen-Ak	1:2000 IB	abcam (UK)
sc-56	humanes PCNA	monoklonaler Maus-Ak	1:1000 IB	Santa Cruz (USA)
Clone PC10	humanes PCNA	monoklonaler Maus-Ak	1:100 IHC	Dako (Dänemark)
2CT25	humane DNA-Polymerase α p180-UE	monoklonaler Maus-Ak	3,3 µg/ml IB	(Zlotkin et al., 1996)
PDG-5G1	humane DNA-Polymerase δ p125-UE	monoklonaler Ratten-Ak (Hybridoma-Überstand)	1:10 IB	Dr. H.-P. Nasheuer (NUI, Galway, Irland)
PDK-7B4	humane DNA-Polymerase δ p50-UE	monoklonaler Ratten-Ak (Hybridoma-Überstand)	1 :10 IB	Dr. H.-P. Nasheuer (NUI, Galway, Irland)
Clone 34	humane DNA-Polymerase ϵ p261-UE	monoklonaler Maus-Ak	1:1000 IB	BD Bioscience (Belgien)
RAC-4D9	humanes RPA p70-UE	monoklonaler Maus-Ak (Hybridoma-Überstand)	1 :5 IB	Dr. H.-P. Nasheuer (NUI, Galway, Irland)
34A	humanes RPA p32-UE	monoklonaler Maus-Ak	1 :10 IB	(Coverley et al., 1992)
sc-751	humanes Cyclin A	polyklonaler Kaninchen-Ak	1:500 IB	Santa Cruz (USA)
sc-245	humanes Cyclin B1	monoklonaler Maus-Ak	1:250 IB	Santa Cruz (USA)
sc-8396	humanes Cyclin D1	monoklonaler Maus-Ak	1:250 IB	Santa Cruz (USA)
sc-481	humanes Cyclin E	polyklonaler Kaninchen-Ak	1:250 IB	Santa Cruz (CA, USA)
Clone G175-1239	humanes p16 ^{INK4A}	monoklonaler Maus-Ak	1:250 IB	BD Bioscience (Belgien)
OP68	humanes p21 ^{CIP1}	monoklonaler Maus-Ak	1:1000 IB	Merck KG (Germany)
sc-1641	humanes p27 ^{KIP1}	monoklonaler Maus-Ak	1:250 IB	Santa Cruz (USA)
sc-8007	humanes PARP	monoklonaler Maus-Ak	1:1000 IB	Santa Cruz (USA)
9502	Caspase 9	polyklonaler Kaninchen-Ak	1:1000 IB	Cell Signaling Technology (USA)

Clone DX2	Fas	monoklonaler Maus-Ak	1 µg/ml AI	Merck Bioscience (Germany)
Clone MIB-1	humanes Ki-67	monoklonaler Maus-Ak	1:20 IF 1:50 IHC	Dako (Dänemark)
Clone 3D4	BrdU	monoklonaler Maus-Ak	1:100 IF	BD Bioscience (Belgien)
ab5	CENP-F	polyklonaler Kaninchen-Ak	1:50 IF	abcam (UK)
Clone AC-15	β-Aktin	monoklonaler Maus-Ak	1:1000 IB	Sigma-Aldrich (Germany)
Clone SAP.4G5	β-Tubulin	monoklonaler Maus-Ak	1:20000 IB	Sigma-Aldrich (Germany)

Tabelle 6: verwendete primäre Antikörper *

Antikörper	Verwendung	Referenzen
anti-Maus-IgG HRP- bzw. AP-Konjugat	1:7500 IB	Promega Biotech (Germany)
anti-Kaninchen-IgG HRP- bzw. AP-Konjugat	1:7500 IB	Promega Biotech (Germany)
anti-Ratte-IgG HRP-Konjugat	1:10000 IB	dianova (Germany)
anti-Maus IgG Cy3-Konjugat	1:500 IF	dianova (Germany)
anti-Kaninchen IgG Cy3-Konjugat	1:500 IF	dianova (Germany)
anti-Ratte IgG Cy2-Konjugat	1:500 IF	dianova (Germany)
anti-Kaninchen IgG Cy2-Konjugat	1:200 IF	dianova (Germany)
anti-Ratte-IgG Biotin-Konjugat	1:200 IHC	Linaris (Germany)
anti-Maus-IgG Biotin-Konjugat	1:200 IHC	Linaris (Germany)

Tabelle 7: verwendete sekundäre Antikörper *

[*Erläuterung der Abkürzungen aus Tabellen 6 und 7: AI (Apoptose-Induktion), Ak (Antikörper), AP (alkaline phosphatase), HRP (horseradish peroxidase), IB (Immunblot), IF (Immunfluoreszenz), IHC (Immunhistochemie), IP (Immunpräzipitation), UE (Untereinheit)]

2.22 Lösungen und Puffer

1x PBS pH 7,4:	13 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ 5 mM KCl 150 mM NaCl	1x TBS(T):	100 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl (0,05% (v/v) Tween® 20)
----------------	---	------------	--

Spezielle Lösungen und Puffer sind bei den entsprechenden Methoden gesondert vermerkt.

2.23 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

BioRad Laboratories GmbH	c.c. pro GmbH
dianova	Merck Bioscience
Fluka Chemie GmbH	Gibco BRL
Greiner	Karl Roth GmbH & Co
Nunc	Promega-Biotech
Qiagen	Sarstedt
Serva	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
VWR	New England Biolabs

Abweichungen sind an entsprechender Stelle vermerkt.

2.24 Geräte

Hersteller/Ort	Gerät
Beckman-Coulter GmbH	Durchflusszytometer EPICS® XL-MCL
Scientific Industries	Vortexer „Genie 2“
Biometra	Elektrophorese-Apparatur „Mini Twin“
Biorad	Blot-Apparatur „Mini-Protean“ Power PAC 200
Schalltec Bandelin	SONOREX Super RK255H
Eppendorf	Zentrifuge 5415 C Thermomixer 5436
Gilson/ABIMED	Pipetten 2-1000 µl
Haake	Wasserbad DC1
H+P Labortechnik GmbH	Monotherm Variomag Elektronikrührer
Heidolph	Taumelgerät Typ Reax3 Überkopf-Schüttler
Hettich	Zentrifuge Rotina 48R Zentrifuge Rotana 46RC
IKA Labortechnik	RET-G Elektronikrührer
Integra Bioscience	Pipettierhilfe „Fireboy Eco“
Mettler Toledo GmbH	Feinwaage PC 200
Nu Aire™	Inkubatoren Nu Air™ IR Autoflow
Olympus GmbH	Mikroskop Olympus CK2-TR
Roth	pH-Meter 3150
Sartorius	Präzisionswaage MC Research RC 250 S
Shimadzu	Spektrophotometer UV-160A
Sigma Osterode	Zentrifuge 3K30
Stratagene	UV-Stratalinker 1800
The Baker Company	Sterilwerkbank Class II Type A/B3
Thermo Electron Corporation	Shandon Cytospin
Carl Zeiss	Mikroskop Axiovert 135

Tabelle 8: Geräte

3 Ergebnisse

3.1 Regulation des humanen Cdc45-Proteins in proliferierenden Zellen

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen machten deutlich, dass einige Replikationsfaktoren in bestimmten Zellzyklusphasen in veränderlichen Proteinmengen vorliegen. So waren Cdc6 während der frühen G₁-Phase (Mendez & Stillman, 2000; Petersen et al., 2000) und Cdt1 während der S- und G₂-Phase (Nishitani et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000) in synchronisierten humanen Kulturzellen nur in geringen Proteinmengen nachweisbar. Andererseits wurde für humanes Mcm2 die Unveränderlichkeit der Proteinmenge im Zellzyklus beschrieben (Todorov et al., 1995; Tsuruga et al., 1997). Um das Verhalten des humanen Cdc45-Proteins zu studieren, musste die Zellpopulation annähernd synchron den Zyklus durchlaufen. HeLa S3- und T98G-Zellen wurden durch einen TdR-Block am G₁/S-Übergang synchronisiert und dann in die nachfolgenden Zellzyklusphasen entlassen (Abschnitt 2.4.1). Die TdR-Applikation führte nicht zur Apoptose, da weder im Western-Blot eine PARP1-Spaltung noch in der Durchflusszytometrie eine Anreicherung von subG₁-Zellen detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Der Synchronisationserfolg wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen verifiziert (Abbildungen 10A und 11A). Der überwiegende Teil der HeLa S3-Zellpopulation befand sich 3h und 6h nach Aufhebung des TdR-Blocks in der S-Phase sowie nach 9h in der G₂/M-Phase (Abbildung 10A). Für T98G-Zellen konnte eine Anreicherung der Zellen in der S-Phase 3h und 6h nach Aufhebung des TdR-Blocks sowie in der G₂/M-Phase nach 9h und 12h beobachtet werden (Abbildung 11A). Neben der Determinierung der Zellzyklusphasen mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der Übergang der Zellen in die einzelnen Phasen durch die definierte Oszillation der Proteinmengen von Cyclin A und Cyclin B1 (Abschnitt 1.1.1) charakterisiert (Abbildungen 10B und 11B). Aus der Literatur war zu entnehmen, dass die Menge des humanen Orc2-Proteins im Verlauf des Zellzyklus konstant blieb (Mendez & Stillman, 2000; Ohta et al., 2003; Stoeber et al., 2001). In HeLa S3- und T98G-Zellen konnte dieser unveränderte Proteingehalt des Orc2 bestätigt werden (Abbildungen 10B und 11B). Auch das Cdc45-Signal zeigte in beiden humanen Zelllinien keine signifikanten zellzyklusabhängigen Variationen (Abbildungen 10B und 11B).

Studien in eukaryotischen Modellorganismen machten deutlich, dass Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation des Cdc45-Proteins bestehen. Während in *Saccharomyces cerevisiae* das Cdc45-Protein in allen Zellzyklusphasen nukleär vorlag (Hopwood & Dalton, 1996; Owens et al., 1997), konnte in *Drosophila*-Embryonen eine phasenspezifische Variation der subzellulären Lokalisation detektiert werden (Loebel et al., 2000). Die Präparation von fraktionierten Extrakten humaner U2OS-Zellen zeigte eine nukleäre und zytoplasmatische Verteilung des humanen Cdc45-Proteins in der S-Phase, währenddessen es in der Mitose nur im Zytoplasma nachweisbar war (Saha et al., 1998b). Bei der biochemischen Zellfraktionierung kann es leicht zur Ruptur der Kernmembranen kommen, so dass sich nukleäre Proteine in der Zytoplasmafraktion finden. Die Immunfluoreszenzmikroskopie bietet die Möglichkeit, die

Lokalisation des humanen Cdc45-Proteins in den einzelnen Zellzyklusphasen proliferierender Zellen genauer zu studieren (Abbildungen 10C und 11C).

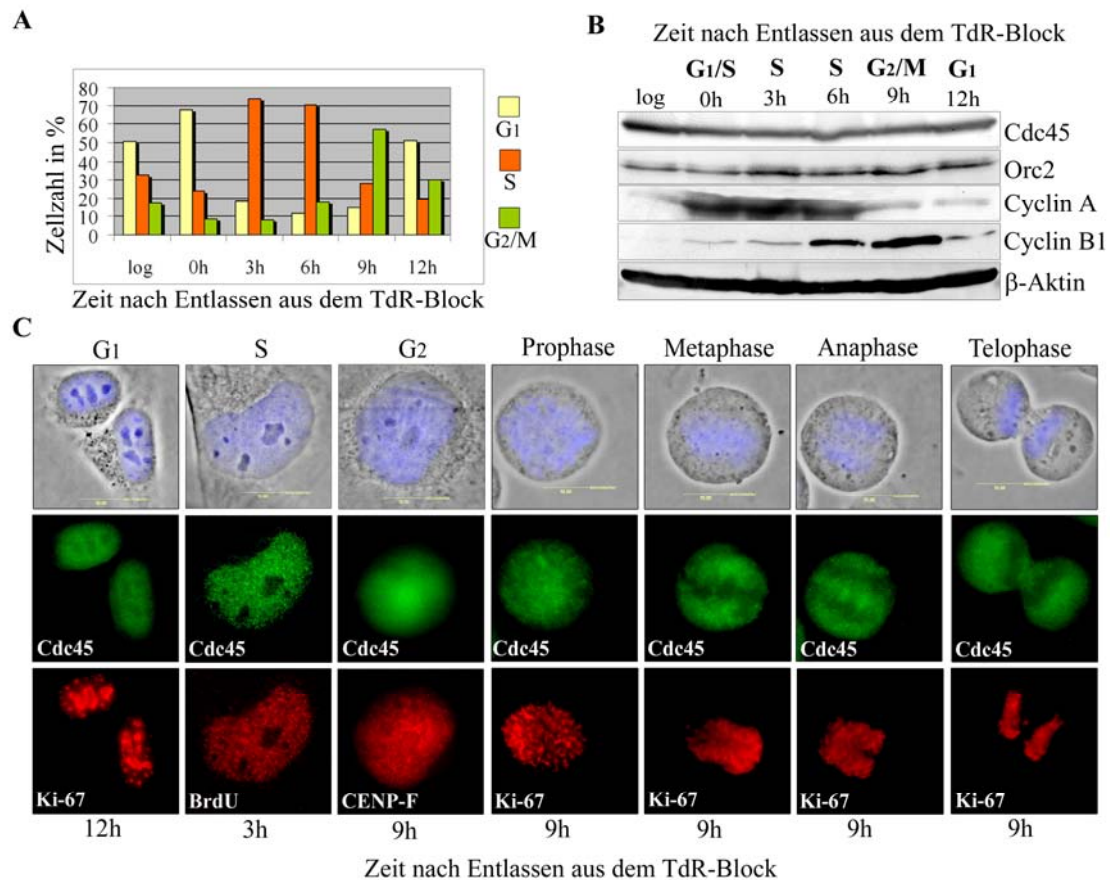


Abbildung 10: Humanes Cdc45-Protein in proliferierenden HeLa S3-Zellen

HeLa S3-Zellen wurden durch einen TdR-Block am G₁/S-Übergang synchronisiert und in die nachfolgenden Zellzyklusphasen entlassen. Für die entsprechenden Studien wurden logarithmische Zellen (log) bzw. Zellen nach Entlassen aus dem TdR-Block (0h-12h) verwendet.

- A** Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung nach Entlassen der Zellpopulation aus dem TdR-Block.
- B** Western-Blot-Analyse der Proteinmengen von Cdc45, Orc2, Cyclin A und Cyclin B1 über den Zellzyklus. Der Nachweis des β-Aktins diente als Ladekontrolle. Von den Proben wurden Ganzzelextrakte präpariert, 75 µg Extrakt je Bahn in 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der immunchemische Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifischen primären und sekundären HRP- bzw. AP-gekoppelten Antikörpern.
- C** Subzelluläre Lokalisation des Cdc45-Proteins (in grün). Die Zellzyklusphasen wurden durch spezifische Marker definiert (in rot): Ki-67 für G₁- und Mitose-Phasen, BrdU für S- und CENP-F für G₂-Phase. Die in der Phasenkontrast/DAPI-Darstellung gezeigte gelbe Markierungslinie entspricht 10 µm (100x Vergrößerung).

Zur Bestimmung der Zellzyklusphasen bei mikroskopischen Studien wurde der Nachweis phasenspezifischer Antigene etabliert. Das Ki-67-Protein war in frühen G₁-Zellen Nukleoli-assoziiert und punktuell im Nukleoplasma verteilt (Bridger et al., 1998; van Dierendonck et al., 1991) (Abbildungen 10C und 11C). Weiterhin wurden G₁-Zellen durch die Abwesenheit von Cyclin B1 identifiziert (Daten nicht gezeigt). Hingegen war Ki-67 in der Prophase mit dem kondensierenden Chromatin assoziiert (Gerdes et al., 1984; Gerdes et al., 1983; Verheijen et al., 1989) (Abbildungen 10C und 11C). Mit Beginn der Metaphase bis zur Telophase fand sich Ki-67 dann an der Oberfläche der Chromosomen (du Manoir et al., 1991; Starborg et al., 1996; Verheijen et al., 1989) (Abbildungen 10C und 11C). Zur Markierung der S-Phase wurde den Zellen 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin (BrdU) mit dem Medium verabreicht (Abschnitt 2.12.1). BrdU wurde in die naszierende DNA eingebaut und konnte mit spezifischen Antikörpern

nachgewiesen werden (Dolbeare, 1995; O'Keefe et al., 1992). Diese Markierung erlaubte die Identifizierung der Zellen, die zum *pulse*-Zeitpunkt aktiv replizierten. Jeder BrdU-Fokus repräsentiert mehrere simultan initiierte Replikationsstartpunkte (Nakayasu & Berezney, 1989; Painter & Young, 1976). Das hier gezeigte BrdU-Muster war charakteristisch für die frühe S-Phase (O'Keefe et al., 1992), in der euchromatische DNA verdoppelt wird (Abbildungen 10C und 11C).

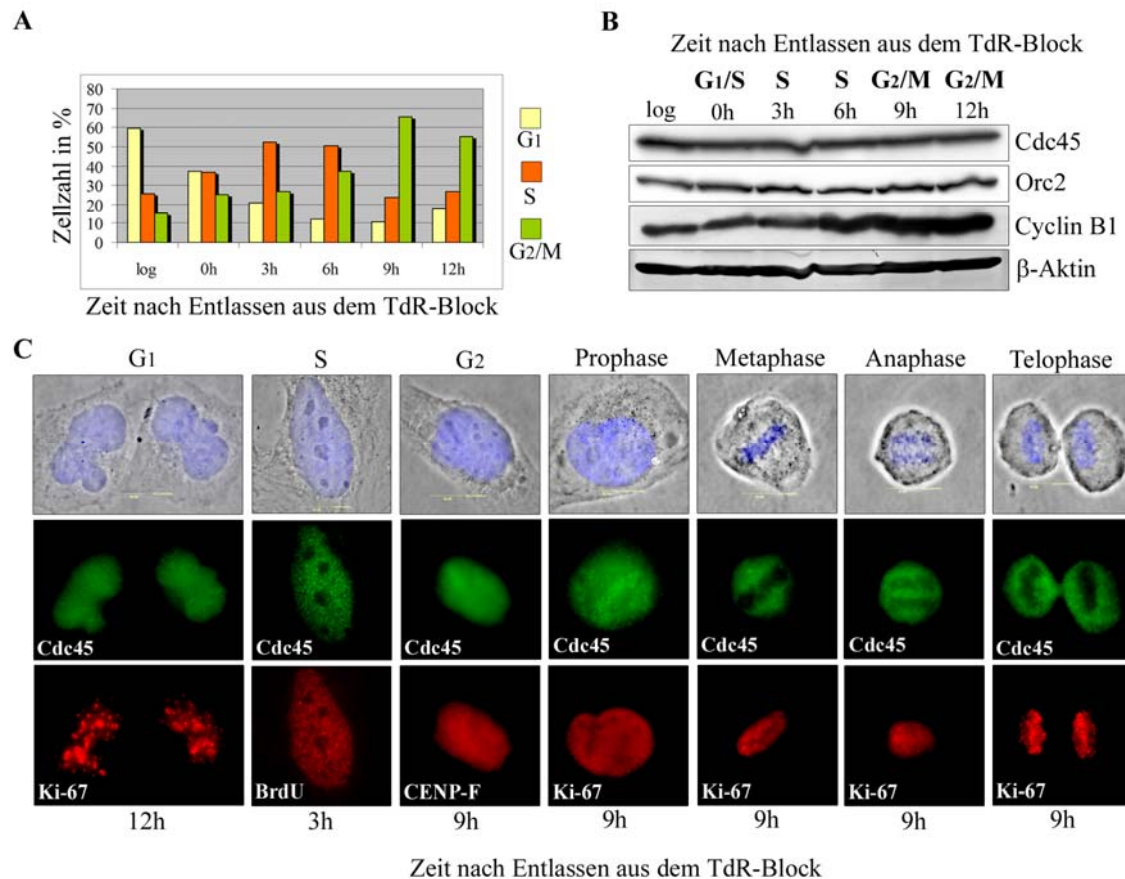


Abbildung 11: Humanes Cdc45-Protein in proliferierenden T98G-Zellen

T98G-Zellen wurden durch einen TdR-Block am G₁/S-Übergang synchronisiert und in die nachfolgenden Zellzyklusphasen entlassen. Für die entsprechenden Studien wurden logarithmische Zellen (log) bzw. Zellen nach Entlassen aus dem TdR-Block (0h-12h) verwendet.

- A Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung nach Entlassen der Zellpopulation aus dem TdR-Block.
 B Western-Blot-Analyse der Proteinmengen von Cdc45, Orc2, Cyclin B1 und des β-Aktins über den Zellzyklus. Beschreibungen analog Abbildung 10B.
 C Subzelluläre Lokalisation des Cdc45-Proteins (in grün). Beschreibungen analog Abbildung 10C.

Das *centromer protein E* (CENP-F) wurde zur Identifizierung von G₂-Zellen detektiert (Liao et al., 1995; Rattner et al., 1993). CENP-F war vornehmlich in der G₂-Phase uniform im Zellkern verteilt, wobei aber die Nukleoli ausgespart blieben (Abbildungen 10C und 11C).

Das humane Cdc45-Protein war von der G₁- bis zur G₂-Phase ausschließlich im Zellkern zu finden (Abbildungen 10C und 11C). In den mitotischen sub-Phasen, nach Auflösung der Kernmembran, wurde demgegenüber eine gleichmäßige Verteilung des Proteins in der gesamten Zelle detektiert, wobei eindeutig die chromosomalen Regionen ausgespart blieben (Abbildungen 10C und 11C). Ferner änderte sich die Cdc45-Lokalisation in der Zelle von einem eher diffusen Muster in der G₁-, G₂- und M-Phase zu distinkten punktuellen Strukturen in der

S-Phase ([Abbildungen 10C und 11C](#)). Die lokalen Cdc45-Ansammlungen in S-Phase-Zellen co-lokalisierten partiell mit BrdU-Signalen ([Bauerschmidt et al., 2007](#)).

3.2 Regulation des humanen Cdc45-Proteins in Zellen, die den mitotischen Zyklus verlassen haben

3.2.1 Humanes Cdc45 in quieszenten Zellen

Die Abwesenheit von Komponenten des prä-replikativen Komplexes wie Cdc6 ([Williams et al., 1998](#); [Williams et al., 1997](#); [Yan et al., 1998](#)), Mcm2, Mcm3 und Mcm5 ([Stoeber et al., 2001](#)) wurde bereits für humane G₀-Fibroblasten beschrieben. Auch war in quieszenten murinen Fibroblasten weder die Cdc45-mRNA noch das -Protein detektierbar ([Arata et al., 2000](#)). Hingegen existierten keine Literaturangaben bezüglich des Verhaltens des Cdc45-Proteins in quieszenten humanen Zellen. Um diesen Aspekt aufzuklären, wurden T98G-Glioblastomzellen und humane embryonale Fibroblasten (HEF) durch eine Kombination aus Serumentzug und Kontaktinhibition in die G₀-Phase überführt ([Abschnitt 2.4.2](#)). Auch nach 20 Tagen Mitogenmangel waren die Zellen vital und metabolisch aktiv und nur ein ganz geringer Anteil abgelöster toter Zellen wurde beobachtet. Im Western-Blot konnte weder eine PARP1-Spaltung noch in der Durchflusszytometrie eine subG₁-Zellpopulation detektiert werden ([Daten nicht gezeigt](#)).

Das Erreichen der Quieszenz definiert sich durch den schnellen Verlust des Ki-67-Proteins und das verzögerte Ansteigen der p27^{KIP1}-Proteinmenge ([Endl et al., 2001](#); [Rivard et al., 1996](#)). Die Akkumulation des Cdk-Inhibitors p27^{KIP1} in quieszenten Zellen kann auf die erhöhte Translation der mRNA ([Hengst & Reed, 1996](#)) und die Erhöhung der Proteinstabilität zurückgeführt werden ([Pagano et al., 1995](#)). p27^{KIP1} inhibiert Cdk4/6- und Cdk2-Komplexe und damit die Zellzyklusprogression ([Sherr & Roberts, 1995](#); [Toyoshima & Hunter, 1994](#)).

Die p27^{KIP1}-Akkumulation und die Abwesenheit von Cyclin A sprachen für ein Erreichen der G₀-Phase eines Großteils der T98G- und HEF-Zellpopulation nach 7 Tagen Serumentzug ([Abbildungen 12A und 12B](#)). Außerdem waren in T98G-Zellen, die 5 Tage unter Mitogenmangelbedingungen gehalten wurden, die beiden Ki-67-Isoformen im Western-Blot nicht mehr nachweisbar ([Abbildung 13A](#)). In quieszenten T98G- und HEF-Zellen konnte weder das Cdc6- noch das Cdc45-Protein immunologisch detektiert werden ([Abbildungen 12A und 12B](#)). Ferner wurde in quieszenten unstimulierten Blut-Lymphozyten eines gesunden Spenders kein Cdc45-Protein nachgewiesen ([Abbildung 25B, Bahn 1](#)). Die Faktoren Mcm2 und Mcm7 persistierten in G₀-Zellen, waren dann aber nach längerem Andauern der Ruhephase (15-20 Tage) nicht mehr vorhanden ([Abbildungen 12A und 12B](#)). Mcm4 dagegen konnte auch nach 20 Tagen Serumentzug in T98G-Zellen und humanen embryonalen Fibroblasten detektiert werden.

Die Expression des Cdc45-Proteins wurde auch immunfluoreszenzmikroskopisch in quieszenten T98G-Zellen untersucht. G₀-Zellen waren Ki-67- ([Gerdes et al., 1984](#); [Gerdes et al., 1983](#)) und Cdc45-negativ sowie im Vergleich zu proliferierenden Zellen deutlich kleiner ([Pellicciari et al., 1995](#)) ([Abbildung 12C](#)).

Es wurde erstmals gezeigt, dass sich humanes Cdc45 wie die Replikationsfaktoren Cdc6 und Mcm2 verhält und in der G₀-Phase nicht mehr detektierbar ist.

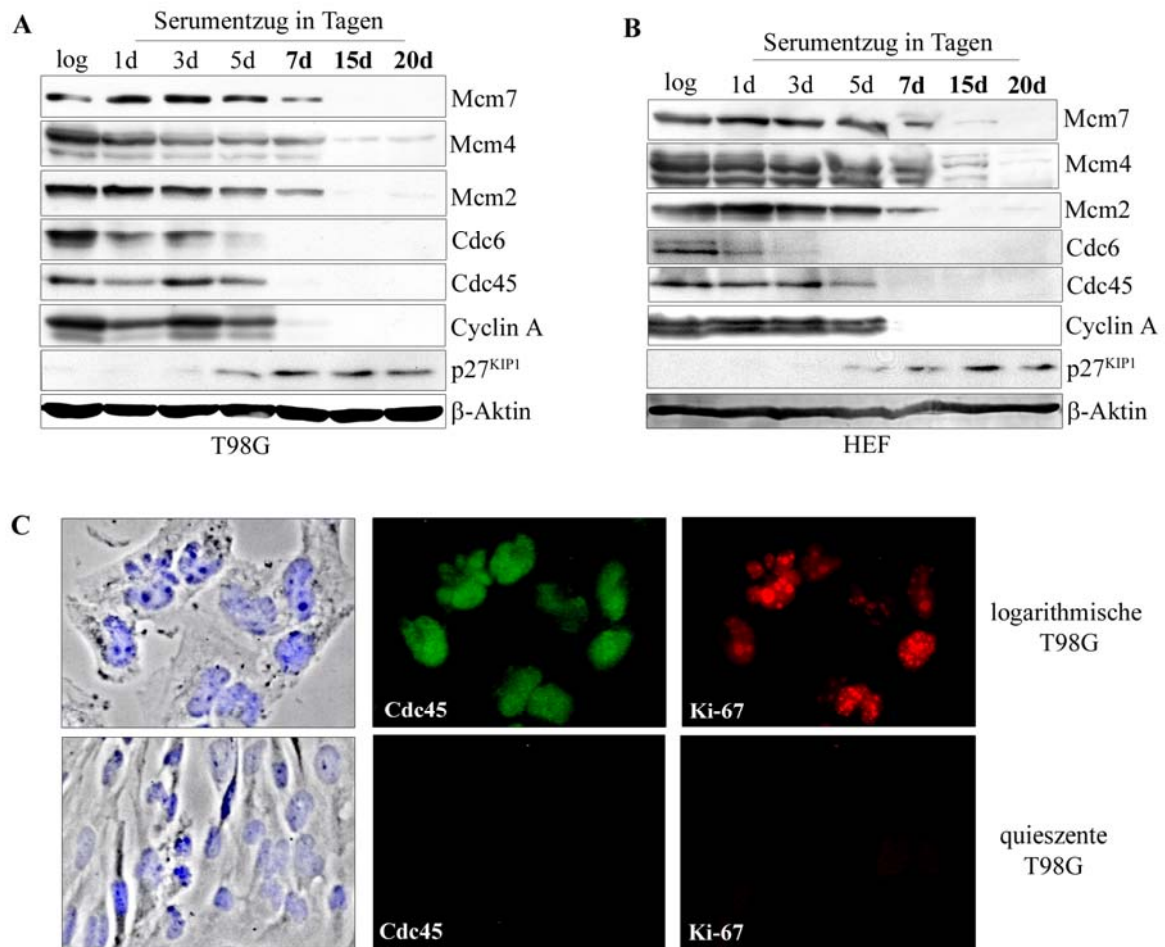


Abbildung 12: Humanes Cdc45-Protein in quieszenten T98G-Zellen und humanen embryonalen Fibroblasten

T98G-Zellen und humane embryonale Fibroblasten (HEF) wurden durch Serumentzug/Kontaktinhibition in die G₀-Phase überführt. Logarithmisch (log) bzw. unter Mitogenmangel (1-20 Tage) gewachsene Zellen wurden für die entsprechenden Studien verwendet.

- A** Western-Blot-Analyse der Proteinmengen von Mcm7, Mcm4, Mcm2, Cdc6, Cdc45, Cyclin A, p27^{KIP1} und des β-Aktins in T98G-Zellen, die unter Serumentzugsbedingungen gehalten wurden. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, Ganzzellextrakte präpariert, 75 µg Extrakt je Bahn in 10% bzw. 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der immunchemische Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifischen primären und sekundären HRP- bzw. AP-gekoppelten Antikörpern.
- B** Western-Blot-Analyse der Proteinmengen von Mcm7, Mcm4, Mcm2, Cdc6, Cdc45, Cyclin A, p27^{KIP1} und des β-Aktins in humanen embryonalen Fibroblasten, die unter Serumentzugsbedingungen gehalten wurden. Beschreibung analog [Abbildung 12A](#).
- C** Detektion des humanen Cdc45-Proteins (in grün) und des Proliferationsmarkers Ki-67 (in rot) in T98G-Zellen. In der oberen Reihe sind logarithmisch wachsende und in der unteren Reihe quieszente T98G-Zellen nach 10 Tagen Serumentzug zu sehen (20x Vergrößerung).

In der G₀-Phase findet keine Replikation, aber im Zuge der *nucleotide excision repair* (NER) DNA-Synthese statt ([Bielas, 2006](#); [Bielas & Heddle, 2004](#)), wofür die DNA-Polymerase δ, PCNA und RPA benötigt werden ([Aboussekhra & Wood, 1995](#); [Reardon & Sancar, 2002](#); [Riedl et al., 2003](#); [Shivji et al., 1992](#); [Touille & Hubscher, 2004](#)). Die eben genannten Replikationsproteine fanden sich in unveränderter bzw. leicht reduzierter Menge in G₀-Zellen, was mit ihrer Funktion in der Reparatur konsistent ist ([Abbildung 13A](#)). Wie bereits beschrieben, war das Cdc45-Protein in der G₀-Phase nicht nachweisbar ([Abbildung 12](#)). Es

könnte jedoch, bei Auslösung von NER beispielsweise durch UV-C-Bestrahlung induziert werden und in chromatingebundener Form an der DNA-Synthese während der Reparatur beteiligt sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in quieszenten T98G-Zellen NER induziert und die löslichen sowie chromatingebundenen Anteile von Cdc45 und PCNA bestimmt (Abschnitt 2.14).

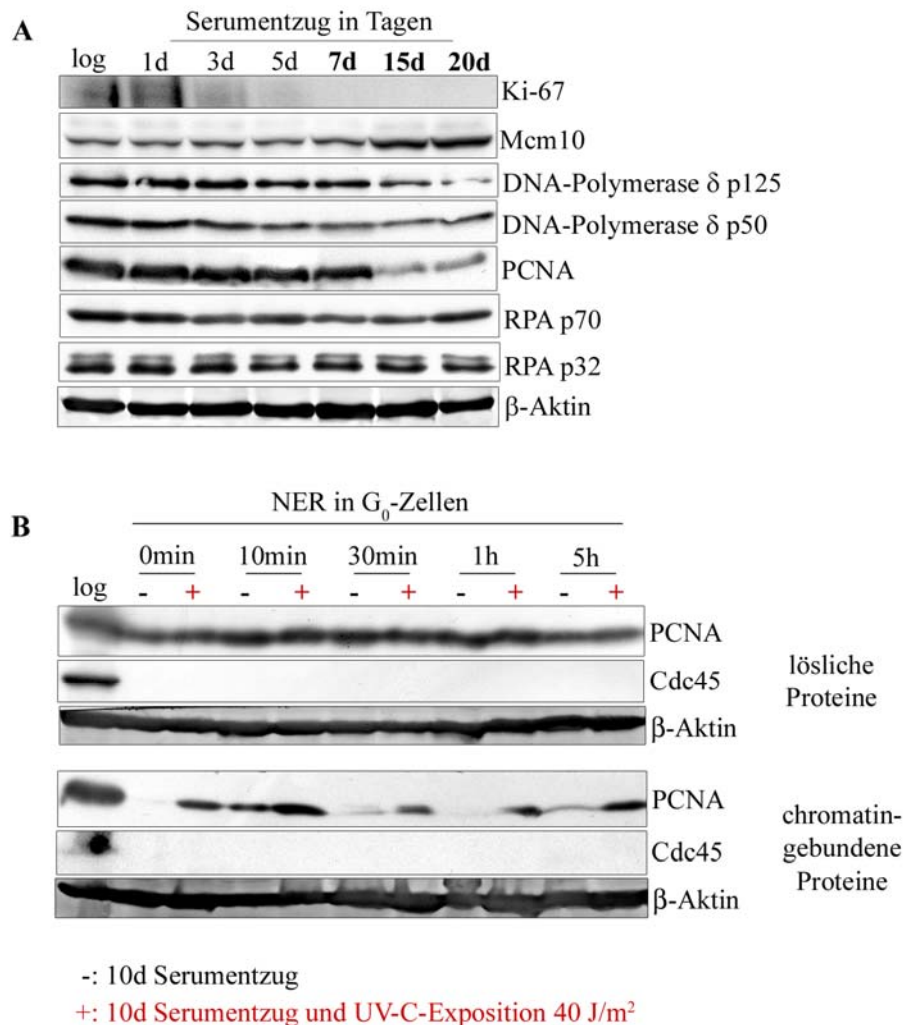


Abbildung 13: Humane Replikationsproteine in quieszenten T98G-Zellen

T98G-Zellen wurden durch Serumentzug/Kontaktinhibition in die G₀-Phase überführt. Logarithmisch (log) bzw. unter Mitogenmangel (1-20 Tage) gewachsene Zellen wurden für die entsprechenden Studien verwendet.

- A** Western-Blot-Analyse der Proteinmengen von Ki-67, Mcm10, DNA-Polymerase δ p125- und p50-Untereinheit, PCNA, RPA p70- und p32-Untereinheit und des β-Aktins in T98G-Zellen, die unter Serumentzugsbedingungen (1-20 Tage) gehalten wurden. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, Ganzzellextrakte präpariert, 75 µg Extrakt je Bahn in 7,5% bzw. 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der immunchemische Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifischen primären und sekundären HRP- bzw. AP-gekoppelten Antikörpern.
- B** Auslösung der *nucleotide excision repair* (NER) in quieszenten T98G-Zellen. Die Zellen wurden nach 10 Tagen Serumentzug zu den angegebenen Zeiten nach Exposition mit 40 J/m² UV-C-Strahlung (+) oder unbehandelt (-) geerntet und fraktionierte Extrakte hergestellt (Abschnitt 2.14). Nach SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen wurden die Proteine PCNA, Cdc45 und β-Aktin in den Fraktionen immunchemisch detektiert.

Die Bindung von PCNA an Chromatin in UV-bestrahlten quieszenten Zellen wurde bereits mit seiner Funktion in der NER assoziiert (Aboussekhra & Wood, 1995; Balajee & Geard, 2001; Miura et al., 1992). 10 min bis 5h nach Auslösung der NER konnte die Bindung eines kleinen Teiles der in G₀-T98G-Zellen vorhandenen löslichen PCNA-Moleküle an Chromatin gezeigt

werden (Abbildung 13B). Cdc45 hingegen wurde weder in löslicher noch in gebundener Form detektiert. Deshalb wird geschlussfolgert, dass Cdc45 für die NER nicht benötigt wird. Wang und Kollegen zeigten bereits, dass Cdc45 ebenfalls nicht in Doppelstrangbruch-Reparatur involviert ist (Wang et al., 2004).

3.2.2 Bestimmung des Zeitpunktes der Neusynthese des Cdc45-Proteins

Stimulationsexperimente mit quieszenten murinen Fibroblasten zeigten die Induktion des Cdc45-Proteins durch Serum und ZnSO_4 (Arata et al., 2000). Nachdem der Nachweis der Abwesenheit des humanen Cdc45-Proteins in quieszenten T98G-Zellen, embryonalen Fibroblasten (Abschnitt 3.2.1) und unstimulierten Blut-Lymphozyten (Abschnitt 3.5) erbracht wurde, war es interessant zu bestimmen, zu welchem Zeitpunkt nach Serumstimulation die Cdc45-Expression in humanen Zellen stattfindet. Dazu wurden T98G-Zellen durch Serumentzug reversibel in die G_0 -Phase überführt und die Rückkehr in den Zellzyklus durch Applikation von FCS-haltigem Medium induziert. Die Zellen wurden zu definierten Zeiten nach Serumstimulation geerntet und für die entsprechenden Analysen verwendet (Abschnitt 2.4.2).

Der Wiedereintritt der Zellen aus der G_0 -Phase in den Zellzyklus wurde durch BrdU-Einbau, mittels durchflusszytometrischer Analysen (Abbildung 14A) sowie im Western-Blot anhand der charakteristischen Expression der Cycline D1, A und B1 sowie des CKI $p27^{\text{KIP1}}$ bestimmt (Abbildungen 2B und 14B).

Um den Anteil replizierender Zellen zu ermitteln, wurden in Parallelexperimenten Zellen auf Objektträgern kultiviert. Im Falle der 0h-Probe wurde BrdU für 24h eingebaut und für die restlichen Proben erfolgte eine BrdU-Inkubation von 30 min. Je Zeitpunkt wurden mehr als 500 Zellen mikroskopisch ausgezählt und der prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellen ermittelt (Abbildung 14A, unten). Eine Zunahme an BrdU-positiven Zellen war 18h nach Serumstimulation nachweisbar, so dass der Übergang der G_1 - zur S-Phase hier angesetzt werden konnte. Auch entsprechend der durchflusszytometrischen Analyse startet die S-Phase nach 18h-21h (Abbildung 14A, oben). Darüber hinaus konnte auch Cyclin A, dessen Expression am G_1 -/S-Übergang bereits beschrieben wurde (Henglein et al., 1994), zu diesen Zeiten nachgewiesen werden (Abbildung 14B).

Wachstumsfaktoren, die den Zellen mit dem FCS zugeführt wurden, steuern über verschiedene Signalwege die Expression von Cyclin D1 und $p27^{\text{KIP1}}$, welche ihrerseits die Rückkehr aus der G_0 - in die G_1 -Phase regulieren (Aguda, 2001; Aktas et al., 1997; Frame & Balmain, 2000; Marshall, 1999). Neuere Studien sprechen auch dem Cyclin C-Cdk3-Komplex signifikante Funktionen beim G_0 - G_1 -Übergang zu (Ren & Rollins, 2004; Sage, 2004) (Abbildung 2A). Sowohl die Synthese der D-Cycline als auch die Assemblierung mit ihren katalytischen Partnern wird durch verschiedene Mitogene reguliert (Matsushime et al., 1994; Meyerson & Harlow, 1994; Sherr, 1993; Sherr, 1994b). Cyclin D1 konnte in G_0 -Zellen nicht nachgewiesen werden, hingegen war es 3h nach Serumstimulation wieder detektierbar (Abbildung 14B). Auf die Funktion der Cyclin D-Cdk4/6-Komplexe in der G_1 -/S-Transition wurde detailliert in Abschnitt 1.1.2 eingegangen. Nach mitogener Stimulation wird $p27^{\text{KIP1}}$ durch die neu entstandenen Cyclin D1-Cdk4-Komplexe sequestriert (Cheng et al., 1998), durch Cyclin E-Cdk2 phosphoryliert und über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut (Montagnoli et al., 1999;

Pagano et al., 1995; Vlach et al., 1997). Auch greifen Phosphoinositol-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/PKB)-Signalwege regulierend in die $p27^{KIP1}$ -Expression ein. PKB phosphoryliert und inaktiviert *forkhead*-Transkriptionsfaktoren, was zu einer verminderten $p27^{KIP1}$ -Expression führt (Dijkers et al., 2000; Medema et al., 2000).

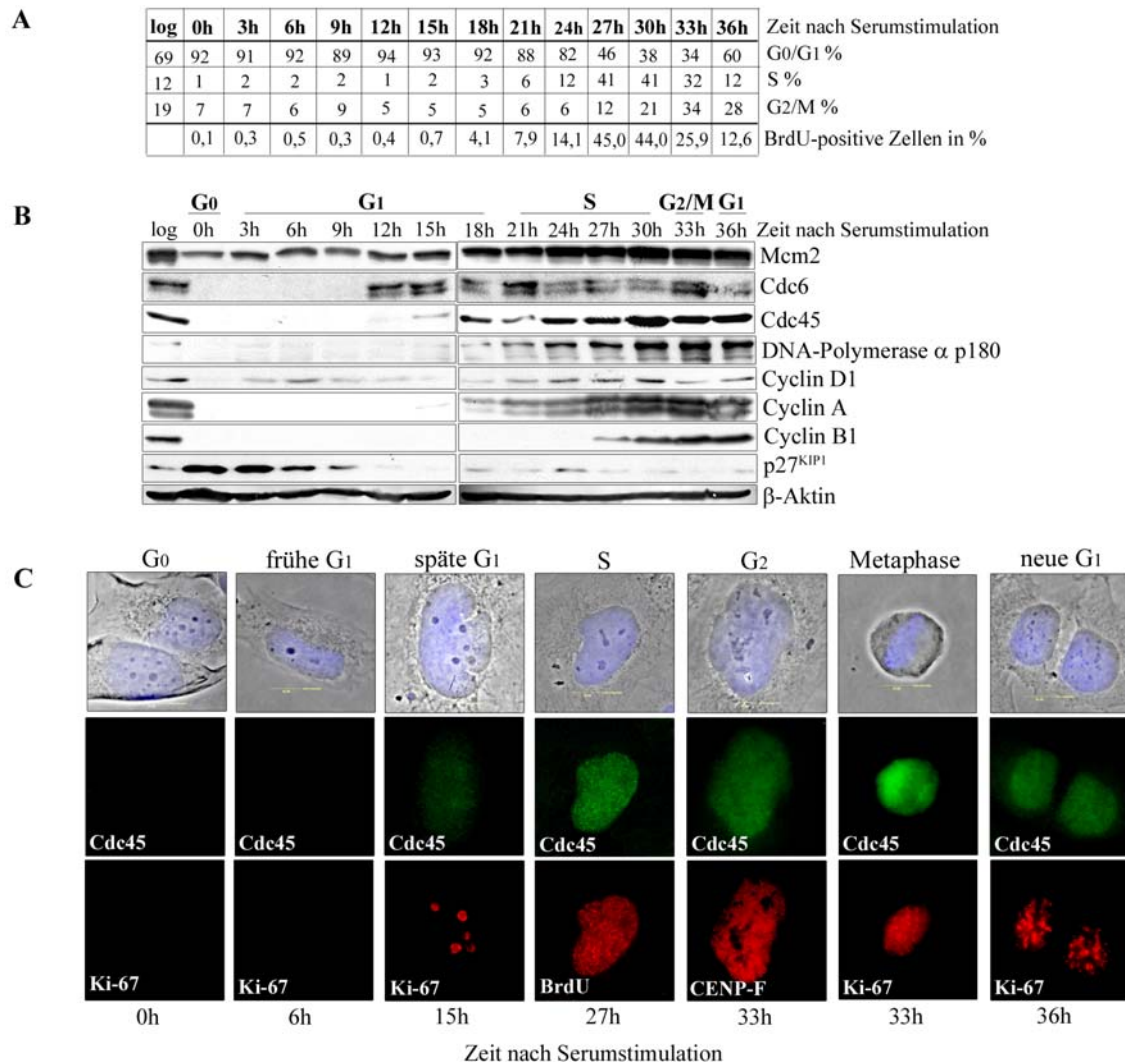


Abbildung 14: De novo-Synthese des humanen Cdc45-Proteins nach mitogener Stimulation

T98G-Zellen wurden durch 10 Tage Serumentzug reversibel in der G₀-Phase arretiert. Durch Splitten der Zellen 1:3 bzw. 1:4 sowie Stimulation mit 10% FCS-supplementiertem Medium wurde die Rückkehr der Zellen in den Zellzyklus induziert. Für die entsprechenden Studien wurden logarithmische Zellen (log) bzw. zu definierten Zeiten nach Serumstimulation geerntete Zellen verwendet.

- A** Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung der T98G-Population (oben) sowie mikroskopische Auszählung des Anteils an BrdU-positiven Zellen (unten).
- B** Western-Blot-Analyse der Proteinmengen von Mcm2, Cdc6, Cdc45, DNA-Polymerase α p180-Untereinheit, Cyclin D1, Cyclin A, Cyclin B1, $p27^{KIP1}$ und des β -Aktins. Dazu wurden Ganzzellextrakte von 200.000 Zellen je Zeitpunkt in 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der immunchemische Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifischen primären und sekundären HRP- bzw. AP-gekoppelten Antikörpern.
- C** Subzelluläre Lokalisation des Cdc45-Proteins (in grün). Die Zellzyklusphasen wurden durch spezifische Marker definiert (in rot): Ki-67 für G₀-, G₁- und Metaphase; BrdU für S-Phase und CENP-F für G₂-Phase. Die in der Phasenkontrast/DAPI-Darstellung gezeigte gelbe Markierungslinie entspricht 10 μ m (100x Vergrößerung).

Western-Blot-Resultate belegten, dass innerhalb der ersten 6h nach Serumstimulation die $p27^{KIP1}$ -Proteinmenge signifikant reduziert wurde (Abbildung 14B). $p27^{KIP1}$ konnte jedoch in geringer Menge auch in zyklisierenden Zellen detektiert werden. Allerdings ist es hier durch Assoziation mit Cyclin D1-Cdk4-Komplexen sequestriert und funktionell inaktiviert (Blain et al.,

1997). Die Rückkehr der T98G-Zellen aus der G₀-Phase in den Zellzyklus ließ sich ferner durch die zeitlich gestaffelte Expression von Cyclin A und Cyclin B1 beweisen (Abschnitt 1.1.2 und Abbildung 14B). Das Cdc45-Protein konnte in der späten G₁-Phase etwa 15h nach Serumstimulation detektiert werden (Abbildung 14B). Hingegen wurde das Cdc6-Protein, welches ein essentieller Bestandteil des prä-replikativen Komplexes ist, bereits nach 12h nachgewiesen. Die p180-Untereinheit der DNA-Polymerase α wurde *de novo* am G₁/S-Übergang gebildet.

Auch Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass nach Serumstimulation Cdc45 etwa zur selben Zeit im Zellkern nachgewiesen werden konnte, wie neusynthetisiertes Ki-67 (Gerdes et al., 1984) (Abbildung 14C).

Demnach wird Cdc45 in humanen Zellen nach Mitogenapplikation in der späten G₁-Phase zeitversetzt nach Cdc6 aber vor der DNA-Polymerase α exprimiert.

3.2.3 Humanes Cdc45 in seneszenten Zellen

Für einige humane Replikationsfaktoren wurde bereits beschrieben, dass sie in seneszenten Zellen nicht gefunden wurden. So konnten in replikativ seneszenten Fibroblasten die Proteine Cdc6, Mcm2, Mcm3 und Mcm5 nicht mehr nachgewiesen werden (Chen et al., 2004; Stoeber et al., 2001).

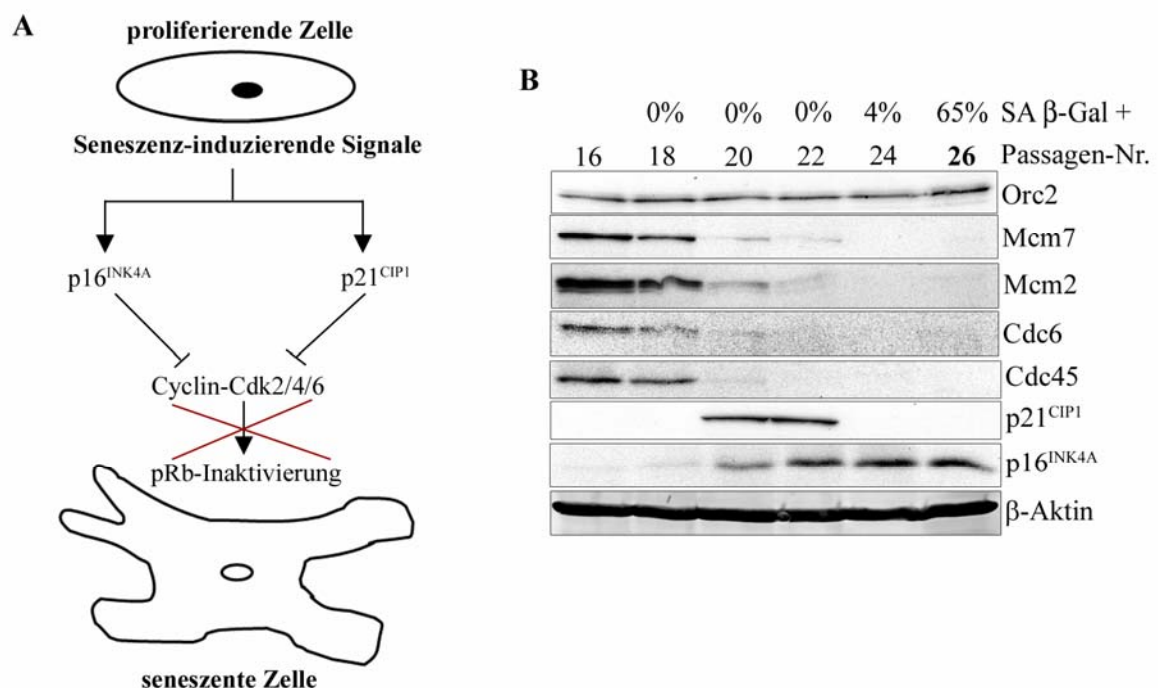


Abbildung 15: Humanes Cdc45-Protein in seneszenten MRC-5-Zellen

Die humanen embryonalen Fibroblasten MRC-5 wurden durch kontinuierliches Passagieren in die Seneszenz überführt.

A Der p53/p21^{CIP1}/pRb- und der p16^{INK4A}/pRb-Signalweg haben essentielle Funktionen beim Übergang der Zellen in die Seneszenz. Die Cdk-Inhibitoren p21^{CIP1} und p16^{INK4A} hemmen die Aktivität der Cyclin-Cdk2/4/6-Komplexe, somit bleibt pRb in einem hypophosphorylierten Zustand und senescente Zellen sind in der G₁-Phase arretiert. Darstellung modifiziert nach (de Magalhaes, 2004; Dimri, 2005; Lundberg et al., 2000).

B Western-Blot-Analyse der Proteinmengen von Orc2, Mcm7, Mcm2, Cdc6, Cdc45, p21^{CIP1}, p16^{INK4A} und des β -Aktins. In den jeweiligen Passagen wurden Proben entnommen, Ganzzelextrakte präpariert, 75 μ g Extrakt je Bahn in 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der immunchemische Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifischen primären und sekundären HRP- bzw. AP-gekoppelten Antikörpern. Der prozentuale Anteil *senescence associated β -galactosidase*-positiver Zellen (SA β -Gal +) wurde durch mikroskopische Auszählung für die entsprechenden Passagen bestimmt.

Auch war das Cdc6-Protein in IMR-90-Zellen, die durch oxidativen Stress den seneszenten Phänotyp ausbildeten, nicht mehr detektierbar (Chen et al., 2004). Um Aussagen über das humane Cdc45-Protein in seneszenten Zellen treffen zu können, wurden die Fibroblasten-Linien MRC-5 und WI-38 durch kontinuierliches Passagieren in die replikative Seneszenz überführt (Abschnitt 2.5).

Seneszente Zellen definieren sich durch morphologische und metabolische Veränderungen sowie einen irreversiblen G₁-Arrest (Campisi, 1997a). Die morphologischen Veränderungen seneszenten Zellen (Campisi, 1996; Sherwood et al., 1988) werden hier exemplarisch an WI-38-Fibroblasten demonstriert. Im Vergleich zu spindelförmigen jungen WI-38-Zellen (Passage 16) waren seneszente WI-38-Zellen (Passage 28) stark vergrößert, abgeflacht und besaßen einen deutlich größeren Zytoplasmaanteil (Abbildung 16A).

Weiterhin wurde beschrieben, dass sich seneszente Zellen durch die Zunahme der Menge und Größe der Lysosomen auszeichnen (Brunk et al., 1973; Robbins et al., 1970). Ein akzeptierter Marker für seneszente Zellen ist die Expression einer lysosomalen Hydrolase, welche den Namen *senescence associated β -galactosidase* (SA β -Gal) trägt (Dimri et al., 1995). Die Aktivität dieses Enzyms wurde in seneszenten Zellen (Abschnitt 2.5) durch Blaufärbung der Lysosomen oder des gesamten Zytoplasmas sichtbar gemacht (Abbildung 16A). Deutlich zeigte sich, dass sowohl bei WI-38- als auch bei MRC-5-Fibroblasten der Anteil an SA β -Gal-positiven Zellen auf 65% in Passage 26 angestiegen war und somit ein Großteil der Population als seneszent eingestuft werden konnte (Abbildungen 15B und 16C).

In einigen seneszenten Fibroblasten-Linien wurde ferner eine Art fakultativen Heterochromatin, so genannte *senescence associated heterochromatin foci* (SAHF) nachgewiesen (Narita et al., 2003) (Abschnitt 4.2). Solche SAHFs konnten in mikroskopischen Analysen durch Anfärbung der chromosomalen DNA mit DAPI bei WI-38-Fibroblasten der Passagen 26 (Daten nicht gezeigt) und 28 (Abbildung 16B, untere Serie) detektiert werden. Narita und Mitarbeiter beschrieben auch, dass seneszente Zellen nur noch einen Nucleolus besitzen (Narita et al., 2003). Auch dieses Merkmal konnte in WI-38-Fibroblasten der Passage 28 gefunden werden (Abbildung 16B, untere Serie).

Wichtig für den Eintritt in und die Erhaltung des seneszenten Zustandes sind die p53/p21^{CIP1}/pRb- und p16^{INK4A}/pRb-Signalwege (Ben-Porath & Weinberg, 2005; Campisi, 2005; Dimri, 2005; Herbig & Sedivy, 2006). Dabei kooperieren die CKIs p21^{CIP1} und p16^{INK4A} und halten pRb in einem hypophosphorylierten Zustand, so dass der Zellzyklus in der G₁-Phase arretiert ist (Abbildung 15A). Die Proteinmenge des p21^{CIP1} war in prä-seneszenten Zellen erhöht und fiel wieder ab, als die Zellen die Seneszenz erreicht hatten (Alcorta et al., 1996; Stein et al., 1999; Wong & Riabowol, 1996) (Abbildungen 15B und 16C). Hingegen blieb die p16^{INK4A}-Proteinmenge in seneszenten Zellen erhöht (Alcorta et al., 1996; McConnell et al., 1998; Stein et al., 1999) (Abbildung 15B). Es wurde spekuliert, dass p21^{CIP1} initial und temporär die pRb-Phosphorylierungen inhibiert, währenddessen p16^{INK4A} für die permanente Inhibition der pRb-Phosphorylierungen verantwortlich ist (Beausejour et al., 2003).

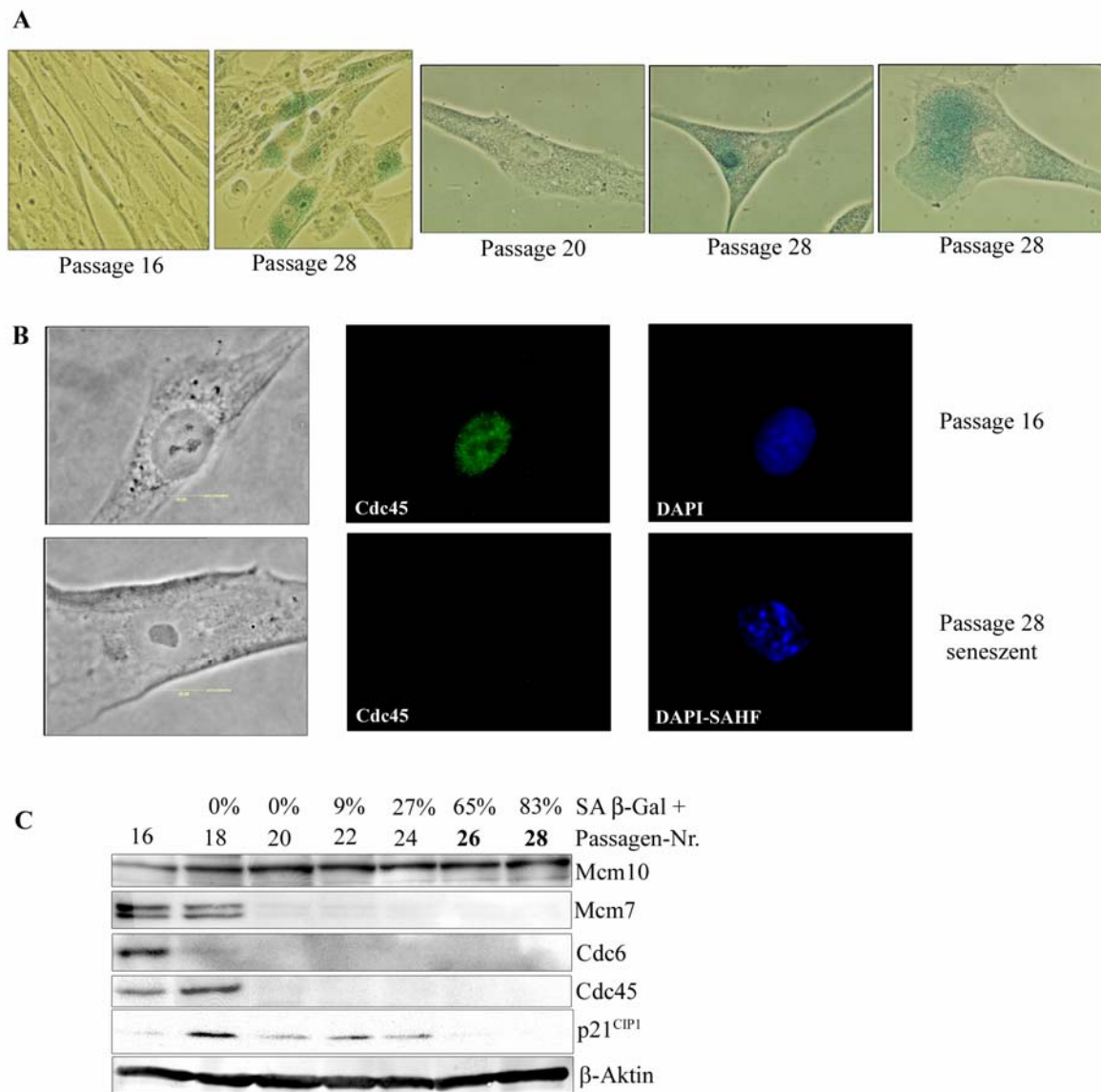


Abbildung 16: Humanes Cdc45-Protein in seneszenten WI-38-Zellen

Die humanen embryonalen Fibroblasten WI-38 wurden durch kontinuierliches Passagieren in die Seneszenz überführt.

- A** Senescente Zellen zeichnen sich durch die Expression einer *senescence associated β-galactosidase* (SA β-Gal) aus, deren Aktivität als Blaufärbung im Zytoplasma sichtbar gemacht werden konnte (Passage 28). Die linke Serie zeigt Zellen in 20x Vergrößerung, die rechte Serie Zellen in 63x Vergrößerung.
- B** Die obere Serie zeigt eine WI-38-Zelle in Passage 16 mit detektierbarem Cdc45-Protein im Zellkern. Die untere Serie zeigt eine seneszente WI-38-Zelle in Passage 28 mit charakteristischen *senescence associated heterochromatin foci* (SAHF).
- C** Western-Blot-Analyse der Proteinmengen von Mcm10, Mcm7, Cdc6, Cdc45, p21^{CIP1} und des β-Aktins. Beschreibung analog [Abbildung 15B](#). Der prozentuale Anteil an *senescence associated β-galactosidase*-positiven Zellen (SA β-Gal +) wurde für die entsprechenden Passagen bestimmt.

Die Auswertung der Western-Blot-Resultate machte deutlich, dass sowohl in seneszenten MRC-5- ([Abbildung 15B](#), [Passage 26](#)) als auch in WI-38-Fibroblasten ([Abbildung 16C](#), [Passagen 26 und 28](#)) weder humanes Mcm7- noch Cdc45-Protein nachweisbar waren. Hingegen konnte das Orc2- ([Stoeber et al., 2001](#)) ([Abbildung 15B](#)) sowie das Mcm10-Protein ([Abbildung 16C](#)) in unveränderter Menge auch in seneszenten Zellen detektiert werden.

Überdies untermauerten auch Immunfluoreszenzanalysen die Abwesenheit des Cdc45-Proteins in seneszenten Zellen. Während Cdc45 im Zellkern junger proliferierender WI-38-Fibroblasten detektierbar war ([Abbildung 16B](#), [obere Serie](#)), war es in seneszenten Fibroblasten vollkommen abwesend ([Abbildung 16B](#), [untere Serie](#)).

3.2.4 Humanes Cdc45 in terminal differenzierten Zellen

Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Knippers zeigten die Reduktion des Gehaltes an humanem Mcm3-Protein im Verlauf der PMA-stimulierten Differenzierung von HL60-Zellen (Musahl et al., 1998). Auch konnte bereits die Abwesenheit der humanen Replikationsfaktoren Cdc6, Cdt1 und des Geminins in differenzierten CaCo-2-Zellen belegt werden (Bravou et al., 2005). In K562-Zellen, die sich zu Megakaryozyten differenziert hatten, war zudem humanes Cdc6-Protein nicht mehr vorhanden (Bermejo et al., 2002). Angaben zum Verhalten des humanen Cdc45-Proteins in Kulturzellen, die zur Differenzierung angeregt wurden, waren noch nicht verfügbar. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, wurden die beiden Leukämie-Zelllinien HL60 und K562 für *in vitro*-Differenzierungen genutzt. In Abhängigkeit vom eingesetzten Agens können HL60-Zellen zu Granulozyten [Dimethylsulfoxid (DMSO) (Collins et al., 1978) bzw. *all-trans retinoic acid* (ATRA) (Breitman et al., 1980)] oder zu Monozyten/Makrophagen [Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) (Huberman & Callaham, 1979; Rovera et al., 1979)] differenzieren. K562-Zellen differenzieren sich nach PMA-Applikation zu Megakaryozyten (Whalen et al., 1997).

Der Einsatz von 1,5% (v/v) DMSO zur Induktion der terminalen Differenzierung von HL60-Zellen zu Granulozyten (Juan et al., 1999) führte schon nach 24h zum massiven Zelltod (Daten nicht gezeigt). Für Differenzierungsexperimente wurde deshalb PMA in einer Konzentration verwendet, die auch nach langen Inkubationszeiten nur minimale apoptotische Vorgänge auslöste, was mittels durchflusszytometrischer subG₁-Peak-Detektion verifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). HL60- und K562-Zellen wurden mit 16 nM PMA für bis zu 96h inkubiert (Abschnitt 2.6).

PMA ist ein direkter Stimulator einiger Isoformen der Proteinkinase C (Hecker, 1985; Marks & Gschwendt, 1995), deren Aktivierung wiederum eine vermehrte Bildung der NADPH-Oxidase induziert (Cox et al., 1985; Curnutte et al., 1994; Dekker et al., 2000; Reeves et al., 1999). Die NADPH-Oxidase katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff (O₂) zum Superoxidanion (O₂⁻). Das gebildete O₂⁻ wird dann spontan oder enzymatisch in Hydroxylradikale (OH[•]), Peroxidationen (OH[•]) sowie in Wasserstoffperoxid (H₂O₂) überführt. Die Generierung dieser *reactive oxygen species* (ROS) dient Granulozyten und Monozyten/Makrophagen als Abwehrmechanismus gegen pathogene Mikroorganismen (Rotrosen & Gallin, 1987). Etwa 35% der HL60-Population war 12h nach PMA-Applikation befähigt, ROS zu generieren und Nitroblautetrazolium (NBT) zu reduzieren (Abschnitt 2.6). Diese Eigenschaft der Monozyten/Makrophagen konnte als Ansammlung von blau-schwarzen Diformazan-Granula im Zytoplasma der Zellen detektiert werden (Abbildung 17A). Dass nur einige wenige HL60-Monozyten/Makrophagen NBT reduzieren konnten, korrelierte mit bereits publizierten Daten (Podlich & Kemme, 2000).

HL60-Zellen, die normalerweise in Suspension wachsen, zeigten nach 12h-24h PMA-Inkubation eine für Monozyten/Makrophagen charakteristische Adhärenz in Clustern am Boden des Kulturgefäßes und die Ausbildung prominenter Pseudopodien (Koeffler et al., 1981; Territo & Cline, 1977) (Abbildungen 17C und 17D).

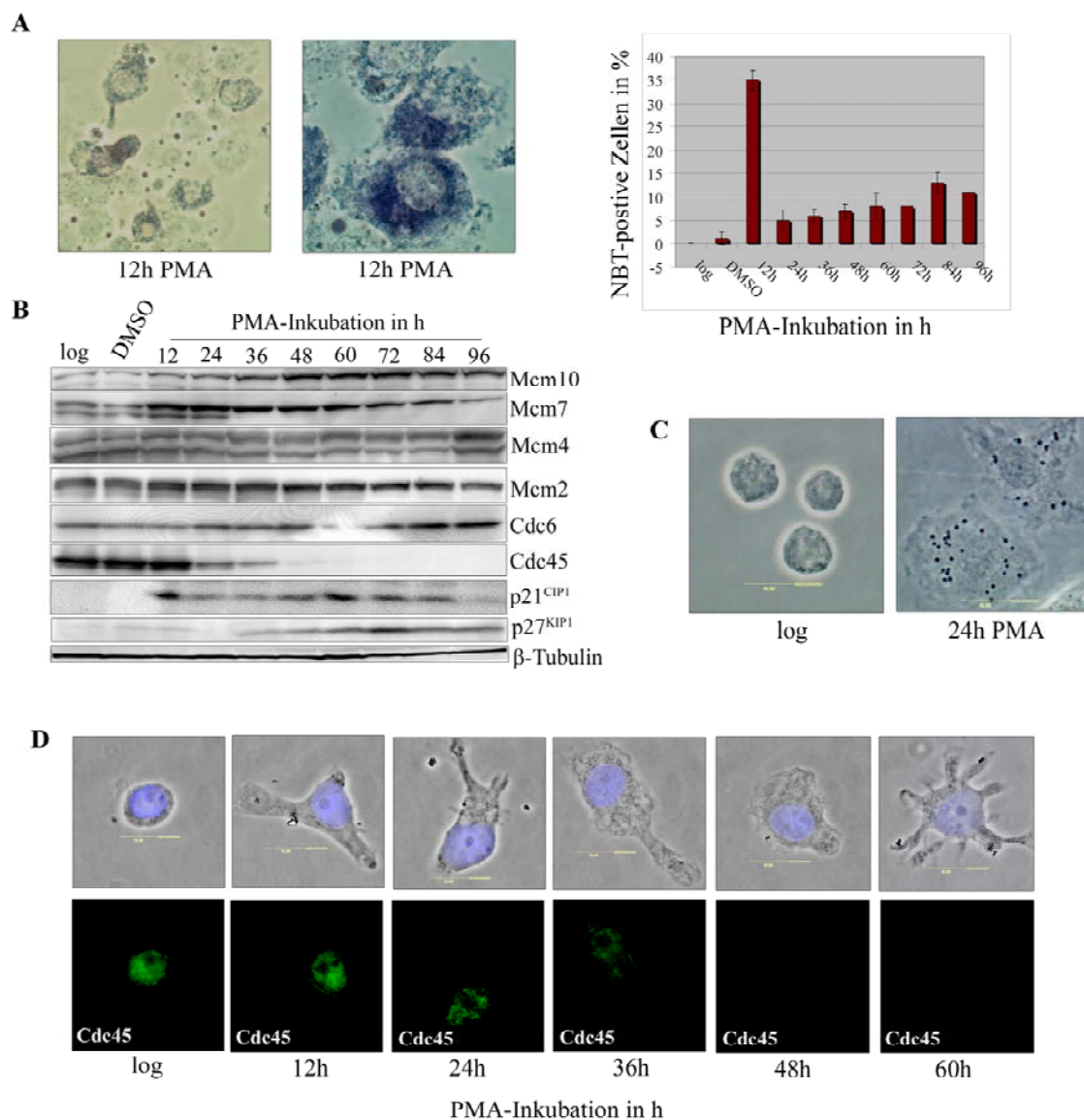


Abbildung 17: Humanes Cdc45-Protein in terminal differenzierten HL60-Zellen

Promyelozytische HL60-Zellen wurden mit 16 nM PMA behandelt, um die terminale Differenzierung zum Monozyten/Makrophagen-Phänotyp zu induzieren. Für die entsprechenden Studien wurden logarithmische Zellen (log) bzw. nur mit Lösungsmittel behandelte (DMSO) oder zu definierten Zeiten nach PMA-Gabe geerntete Zellen (12h-96h) verwendet.

- A** Ein kleiner Teil der HL60-Population bildet 12h nach PMA-Inkubation *reactive oxygen species* (ROS) und reduziert *Nitroblauetrazolium* (NBT) zu einem blau-schwarzen Diformazan. Dargestellt ist die mikroskopische Detektion der NBT-Reduktion nach 12h PMA-Behandlung (links, 20x bzw. 100x Vergrößerung) sowie der prozentuale Anteil der NBT-positiven Zellen über die Zeit (rechts).
- B** Western-Blot-Analyse der Proteinmengen von Mcm10, Mcm7, Mcm4, Mcm2, Cdc6, Cdc45, p21^{CIP1}, p27^{KIP1} und des β-Tubulins. Zu den angegebenen Zeiten nach PMA-Inkubation wurden Proben entnommen, Ganzzellextrakte präpariert, 75 µg Extrakt je Bahn in 10% bzw. 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der immunchemische Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifischen primären und sekundären HRP- bzw. AP-gekoppelten Antikörpern.
- C** HL60-Zellen wachsen normalerweise in Suspension. 24h nach PMA-Inkubation sind die meisten Zellen am Boden des Kulturgefäßes in Clustern adhären und zeigen eine ausgeprägte Pseudopodienbildung, wie sie für Monozyten/Makrophagen charakteristisch ist. Die in der Phasenkontrast/DAPI-Darstellung gezeigte gelbe Markierungslinie entspricht 10 µm (100x Vergrößerung).
- D** Nachweis des Cdc45-Proteins (in grün) in HL60-Zellen nach PMA-Behandlung. Die in der Phasenkontrast/DAPI-Darstellung gezeigte gelbe Markierungslinie entspricht 10 µm (100x Vergrößerung).

Auch K562-Zellen konnten, in Übereinstimmung mit Literaturangaben (Belhacene et al., 1998; Whalen et al., 1997), 96h nach PMA-Inkubation verstärkt adhärent nachgewiesen werden (Abbildung 18A). Außerdem waren PMA-behandelte K562-Zellen deutlich vergrößert und besaßen Megakaryone (Abbildung 18B).

Der irreversible Zellzyklusarrest (Cooper, 2001) infolge der terminalen Differenzierung beider Zelllinien wurde durch die erhöhte Expression von Zellzyklusinhibitoren bzw. die verringerte Expression von Cyclinen detektiert.

Nach PMA-Inkubation haben HL60-Zellen einen G₁-Arrest erfahren, was durch die Erhöhung der Proteinmengen von p21^{CIP1} und p27^{KIP1} dokumentiert wurde (Das et al., 2000; Jiang et al., 1994; Steinman et al., 1994; Zhang et al., 1995; Zhou et al., 1999) (Abbildung 17B).

K562-Zellen zeigten nach PMA-Gabe zwar einige Megakaryozyten-Charakteristika, waren aber nicht in der Lage, den enddifferenzierten Phänotyp zu erreichen, da sie keine Befähigung zur Endoreplikation besitzen (Garcia et al., 2000). Eine Reduktion des Proteingehaltes der für die normale Zellzyklusprogression essentiellen Cycline A und E konnte bereits nach eintägiger PMA-Behandlung gefunden werden (Bermejo et al., 2002; Garcia et al., 2000) (Abbildung 18D). Der Verlust der Proliferationsfähigkeit von K562-Zellen nach Applikation von PMA wurde zudem durch eine nahezu unveränderliche Zellzahl evident (Abbildung 18C).

Da der Aktgehalt von differenzierten HL60-Zellen sehr stark ansteigt (Meyer & Howard, 1983), wurde im Western-Blot als interne Ladekontrolle Tubulin detektiert (Abbildungen 17B und 18D). Für humanes Cdc6-Protein wurden zelllinienabhängig divergente Resultate gefunden. In HL60-Zellen war das Cdc6-Protein auch nach 96h PMA-Behandlung nachweisbar (Abbildung 17B), hingegen war es übereinstimmend mit publizierten Ergebnissen (Bermejo et al., 2002) bereits nach eintägiger PMA-Inkubation in K562-Zellen nicht mehr vorhanden (Abbildung 18D). Das Vorliegen des Cdc6-Proteins in terminal differenzierten HL60-Monozyten/Makrophagen deutet an, dass Cdc6 möglicherweise unabhängig von seiner essentiellen Funktion in der DNA-Replikation noch weitere Aufgaben in diesen Zellen übernimmt (Abschnitt 4.1). Eine signifikante Verringerung des Cdc45-Proteingehaltes wurde sowohl in HL60- (Abbildung 17B) als auch in K562-Zellen (Abbildung 18D) 24h nach PMA-Gabe deutlich. Bereits nach 48h konnte in beiden Zelllinien das humane Cdc45-Protein immunologisch nicht mehr detektiert werden (Abbildungen 17B und 18D). Eine ebenfalls sehr starke Reduktion des Cdc45-Proteinsignals wurde in HL60-Zellen beobachtet, die 5 Tage mit 0,5 µM ATRA inkubiert wurden und sich zu Granulozyten ausdifferenziert hatten (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zum schnellen Verlust des Cdc45-Proteins persistierten die Replikationsfaktoren Mcm10, Mcm7, Mcm4, Mcm2 in terminal differenzierten HL60-Monozyten/Makrophagen (Abbildung 17B) und K562-Megakaryozyten (Abbildung 18D). Weiterhin fanden sich PCNA und die RPA-Untereinheiten p70 und p32 in nahezu unveränderter Menge in differenzierten HL60-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Auch Immunfluoreszenzstudien bestätigten die Abwesenheit des humanen Cdc45-Proteins in HL60-Zellen 48h nach PMA-Inkubation (Abbildung 17D).

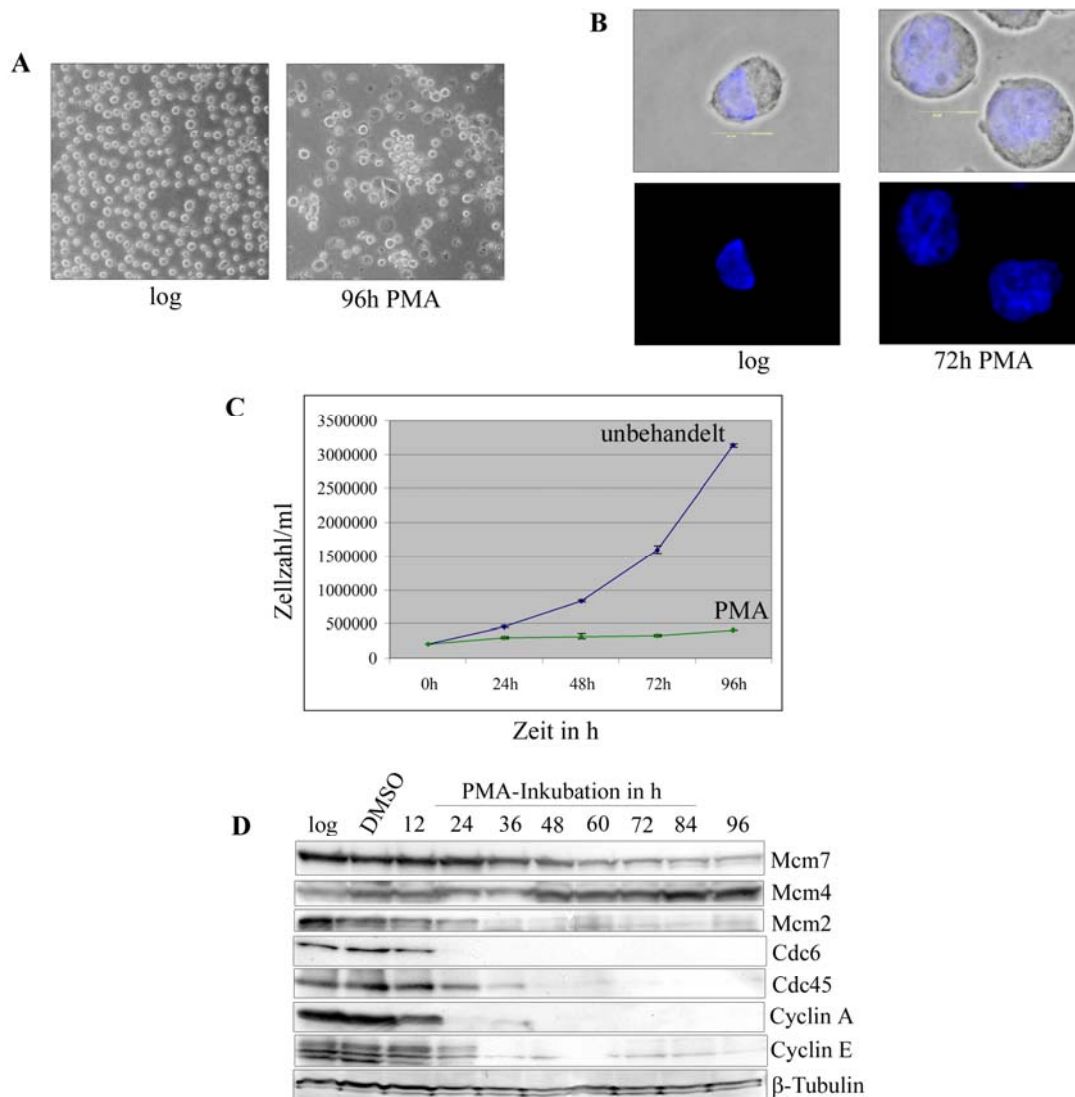


Abbildung 18: Humanes Cdc45-Protein in terminal differenzierten K562-Zellen

K562-Zellen wurden mit 16 nM PMA behandelt, um die terminalen Differenzierung zum Megakaryozyten-Phänotyp zu induzieren. Es wurden logarithmische Zellen (log), Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel behandelt wurden (DMSO) bzw. Zellen, die zu definierten Zeiten nach PMA-Gabe geerntet wurden (12h-96h), für die entsprechenden Studien verwendet.

- A K562-Zellen wachsen normalerweise in Suspension. 96h nach PMA-Inkubation sind viele Zellen vergrößert und wachsen zumeist adhärent am Boden des Kulturgefäßes (10x Vergrößerung).
- B Unbehandelte K562-Zellen besitzen einen kleinen Zellkern, hingegen können in vielen Zellen 72h nach PMA-Inkubation Megakaryone nachgewiesen werden. Die in der Phasenkontrast/DAPI-Darstellung gezeigte gelbe Markierungslinie entspricht 10 µm (100x Vergrößerung).
- C Wachstumskurven unbehandelter und PMA-behandelter K562-Zellen.
- D Western-Blot-Analyse der Proteinmengen von Mcm7, Mcm4, Mcm2, Cdc6, Cdc45, Cyclin A, Cyclin E und des β-Tubulins. Beschreibungen analog [Abbildung 17B](#).

3.2.5 Stabilisierung des Cdc45-Proteins durch proteasomale Inhibitoren

Um zu testen, ob der Verlust des Cdc45-Signals während der PMA-induzierten terminalen Differenzierung von HL60-Zellen durch Proteindegradation erfolgte, wurden Versuche mit lysosomalen und proteasomalen Inhibitoren durchgeführt ([Abschnitt 2.7](#)).

Zur Hemmung des lysosomalen Proteinabbaus wurde eine Kombination aus 100 µM Leupeptin und 20 mM NH₄Cl eingesetzt ([Fuertes et al., 2003](#)). Leupeptin ist ein reversibler Inhibitor von Trypsin- und Cystein-Proteasen ([Brass & Shattil, 1988](#); [Umezawa, 1976](#)). Die schwache Base NH₄Cl bewirkt ein Ansteigen des lysosomalen pH-Wertes ([Mellman et al., 1986](#); [Ohkuma & Poole, 1978](#)).

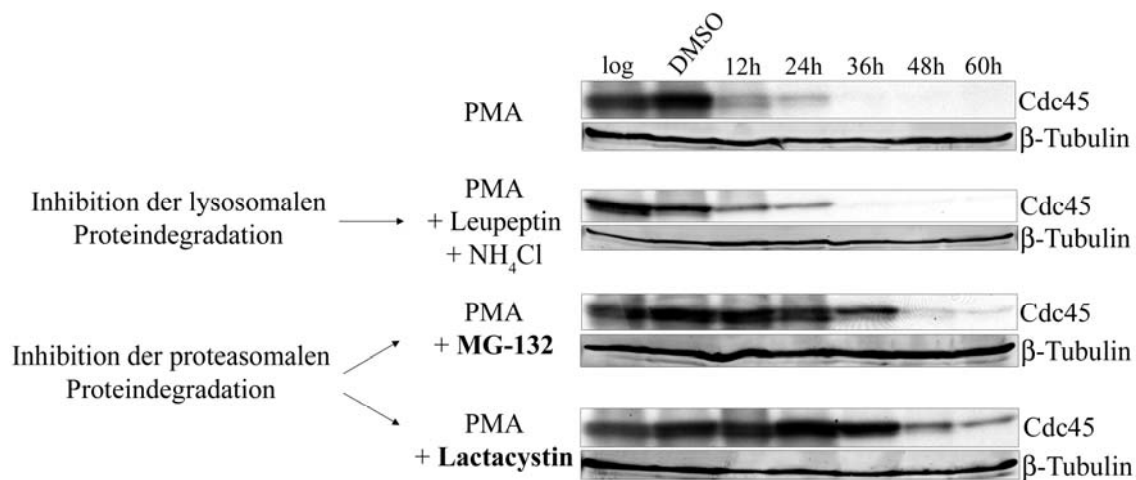


Abbildung 19: Humanes Cdc45-Protein in HL60-Zellen, die mit PMA und lysosomalen bzw. proteasomalen Inhibitoren behandelt wurden

Promyelozytische HL60-Zellen wurden in parallelen Versuchen für 1h mit 100 μM Leupeptin und 20 mM NH_4Cl oder 10 μM MG-132 oder 10 μM Lactacystin vorbehandelt, ehe dem Kulturmedium 16 nM PMA zugesetzt und weiter inkubiert wurde, um die terminalen Differenzierung zum Monozyten/Makrophagen-Phänotyp zu induzieren. Kontrollproben wurden nur mit 16 nM PMA behandelt. Die Proteinmengen von Cdc45 und β -Tubulin wurden immunchemisch detektiert. Beschreibung analog [Abbildung 17B](#).

Als gut dokumentierte Proteasom-Hemmer wurden 10 μM MG-132 und 10 μM Lactacystin verwendet ([Fenteany & Schreiber, 1998](#); [Lee & Goldberg, 1998](#); [Myung et al., 2001](#)). MG-132 zählt zu den Peptidaldehyden und inhibiert reversibel die proteolytische Aktivität des 26S-Proteasoms. Hingegen bewirkt Lactacystin bzw. das in wässrigen Lösungen entstehende β -Lacton-Derivat eine irreversible Hemmung des 26S-Proteasoms.

Im Vergleich zu nur PMA-behandelten Zellen konnte eine Stabilisierung des Cdc45-Proteins durch gleichzeitige Gabe der proteasomalen Inhibitoren MG-132 oder Lactacystin während der terminalen Differenzierung der HL60-Zellen beobachtet werden ([Abbildung 19](#)). Eine Inhibierung des lysosomalen Proteinabbaus durch kombinierte Applikation von Leupeptin, NH_4Cl und PMA zeigte eine ähnliche Reduzierung des Cdc45-Proteingehaltes wie in nur PMA-behandelten Zellen ([Abbildung 19](#)). Auch die Behandlung der HL60-Zellen mit NH_4Cl und PMA oder Leupeptin und PMA zeigte Cdc45-Signale, die mit dem Signal nach ausschließlicher PMA-Applikation vergleichbar waren ([Daten nicht gezeigt](#)).

Die offensichtliche Stabilisierung des humanen Cdc45 durch proteasomale Inhibitoren deutet auf eine Degradation des Proteins durch das Ubiquitin-Proteasom-System hin. Erste Versuche, eine Ubiquitinierung des Cdc45-Proteins in frühen Phasen der terminalen Differenzierung von PMA- und MG-132-behandelten HL60-Zellen durch Immunpräzipitation mit Ubiquitin-spezifischen Antikörpern nachzuweisen, waren leider nicht erfolgreich ([Daten nicht gezeigt](#)). Im [Abschnitt 4.7b](#) werden weitere Möglichkeiten zur Detektion des putativ ubiquitinierten humanen Cdc45-Proteins vorgestellt.

3.2.6 Humanes Cdc45 in apoptotischen Zellen

Vor kurzem sind einige Replikationsfaktoren als neue Caspase-Substrate identifiziert worden. Für humanes Cdc6 ([Pelizon et al., 2002](#); [Schories et al., 2004](#); [Yim et al., 2006](#); [Yim et al., 2003](#)), Mcm3 ([Schories et al., 2004](#); [Schwab et al., 1998](#)) und Geminin ([Roukos et al., 2007](#)) wurden in apoptotischen Zellen charakteristische Spaltprodukte nachgewiesen. Der Aspekt, ob

humanes Cdc45-Protein im Zuge des programmierten Zelltods auch definiert gespalten wird, sollte in der vorliegenden Dissertation aufgeklärt werden. Dazu wurde in humanen Zelllinien mit Hilfe diverser Stimuli Apoptose induziert ([Abschnitt 2.8](#)).

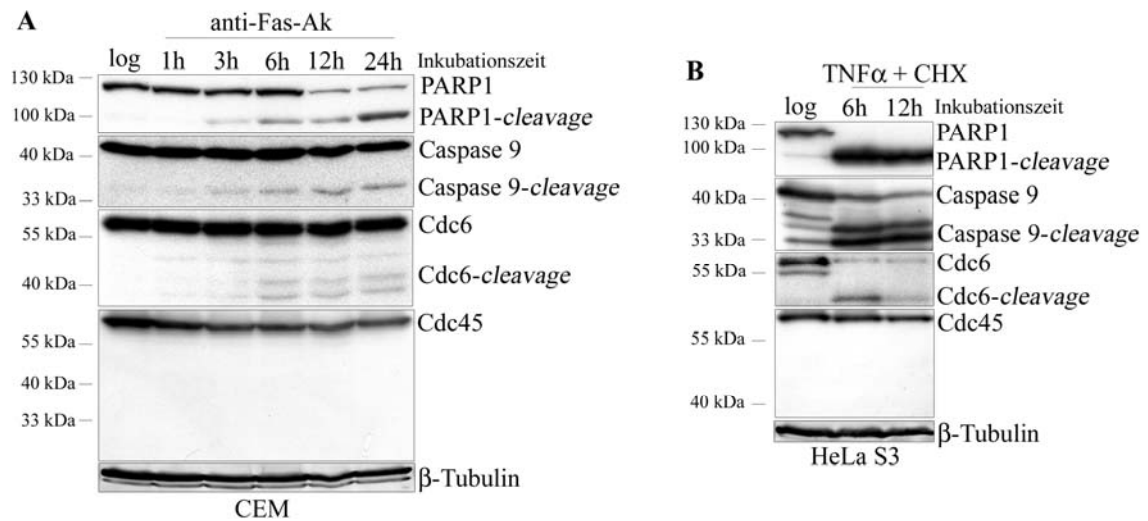


Abbildung 20: Humanes Cdc45-Protein in apoptotischen CEM- und HeLa S3-Zellen

Induktion der Apoptose bei CEM-Zellen durch Inkubation mit anti-Fas-Antikörper (1 µg/ml anti-Fas-Ak) und bei HeLa S3-Zellen durch Inkubation mit Tumor-Nekrose-Faktor α und Cycloheximid (100 ng/ml TNFα + 5 µg/ml CHX) und Ernte der Zellen zu definierten Zeiten nach Zugabe der Apoptoseinduktoren bzw. logarithmischer Zellen (log).

- A** Western-Blot-Analyse der Proteine PARP1, Caspase 9, Cdc6, Cdc45 und des β-Tubulins in anti-Fas-Ak-behandelten CEM-Zellen. Auf 10%ige SDS-Polyacrylamidgelen wurde je Zeitpunkt 75 µg Ganzzellextrakt aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die entsprechenden Proteine wurden immunchemisch detektiert.
- B** Western-Blot-Analyse der Proteine PARP1, Caspase 9, Cdc6, Cdc45 und des β-Tubulins in TNFα- und CHX-behandelten HeLa S3-Zellen. Auf 10% bzw. 12,5%ige SDS-Polyacrylamidgelen wurde je Zeitpunkt 75 µg Ganzzellextrakt aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und die Proteine immunchemisch nachgewiesen.

Die Spaltung von Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP1) wurde als Marker für apoptotische Vorgänge detektiert ([Kaufmann et al., 1993](#); [Shah et al., 1995](#)) ([Abbildungen 20A, 20B, 21B und 21D](#)). Darüber hinaus konnte im Falle der Induktion der rezeptorvermittelten Apoptose bei CEM- ([Abbildung 20A](#)) und HeLa S3-Zellen ([Abbildung 20B](#)) die Spaltung der zu den Initiator-Caspasen zählenden Caspase 9 gezeigt werden. Als weiteres Apoptose-Charakteristikum wurde der Anteil an hypodiploiden/subG₁-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt ([Nicoletti et al., 1991](#); [Zamai et al., 1993](#)). Im Zuge der fortgeschrittenen Apoptose wird die DNA fragmentiert. Bei der Vorbereitung der Proben für die durchflusszytometrische Analyse werden die Zellen mit Ethanol fixiert bzw. permeabilisiert ([Abschnitt 2.11](#)) und DNA-Fragmente können aus den Zellen austreten. Demzufolge liegt im Histogramm das Signal der subG₁-Zellen vor dem Signal der normalen G₁-Zellen ([Abbildungen 21A und 21C](#)).

Die in der Literatur dokumentierte Spaltung des humanen Cdc6-Proteins ([Pelizon et al., 2002](#); [Schories et al., 2004](#); [Yim et al., 2006](#); [Yim et al., 2003](#)) wurde in apoptotischen CEM- und HeLa S3-Zellen verifiziert ([Abbildungen 20A und 20B](#)). Auch die von Schwab und Mitarbeitern bereits gezeigte limitierte Mcm2-Spaltung in spätapoptotischen Jurkat-Zellen und im Gegensatz dazu die Unveränderlichkeit des Mcm7-Proteinsignals ([Schories et al., 2004](#); [Schwab et al., 1998](#)) fanden sich in UV-C-bestrahlten HeLa S3-Zellen ([Abbildung 21D](#)).

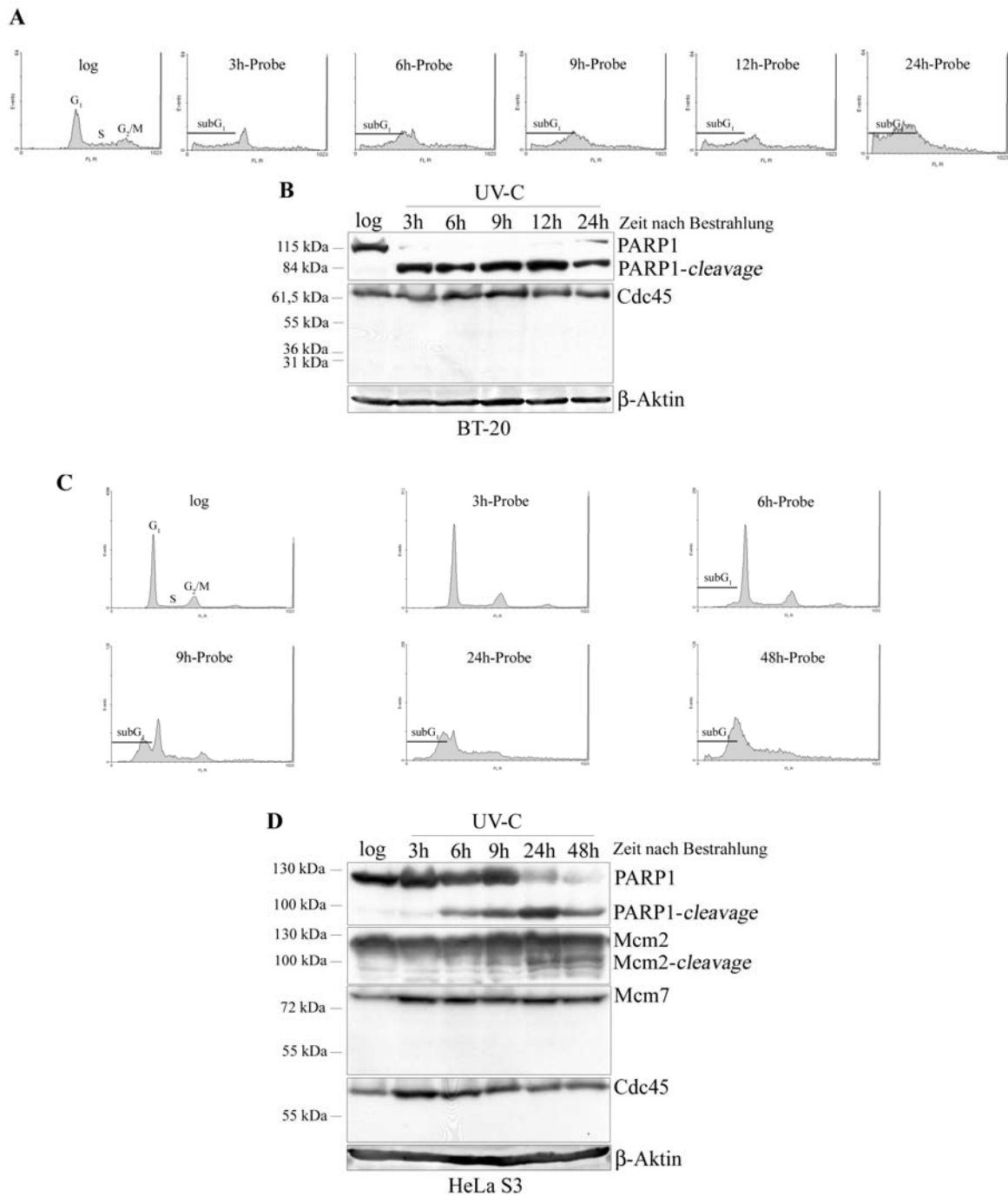


Abbildung 21: Humanes Cdc45-Protein in apoptotischen BT-20- und HeLa S3-Zellen

Induktion der Apoptose durch UV-C-Bestrahlung von BT-20- (200 J/m^2) bzw. HeLa S3-Zellen (150 J/m^2) und Ernte der Zellen zu definierten Zeiten nach Bestrahlung bzw. logarithmischer Zellen (log).

- A Durchflusszytometrische Analyse der UV-C-bestrahlten BT-20-Zellen zur Detektion des subG₁-Peaks.
- B Western-Blot-Analyse der Proteine PARP1, Cdc45 und des β-Aktins in UV-C-bestrahlten BT-20-Zellen. Auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel wurde je Zeitpunkt Ganzzellextrakt von 200.000 Zellen aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die entsprechenden Proteine wurden immunchemisch detektiert.
- C Durchflusszytometrische Analyse der UV-C-bestrahlten HeLa S3-Zellen zur Detektion des subG₁-Peaks.
- D Western-Blot-Analyse der Proteine PARP1, Mcm2, Mcm7, Cdc45 und des β-Aktins in UV-C-bestrahlten HeLa S3-Zellen. Auf 10%ige SDS-Polyacrylamidgele wurde je Zeitpunkt 75 µg Ganzzellextrakt aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die entsprechenden Proteine wurden immunchemisch nachgewiesen.

Unabhängig davon, ob auf extrinsischem (Abbildungen 20A und 20B) oder intrinsischem Weg (Abbildungen 21B und 21D) Apoptose induziert wurde, blieb das Cdc45-Proteinsignal unveränderlich und es konnten keine Spaltprodukte detektiert werden. Ferner wurde weder in Etoposid-behandelten HL60-Zellen, noch in TNF α -behandelten MCF-7-Zellen eine Spaltung des humanen Cdc45-Proteins nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Cdc45 zählt demnach wie Orc2, Mcm5 oder Mcm7 (Pelizon et al., 2002; Schwab et al., 1998) zu den Replikationsproteinen, die in apoptotischen Zellen keine Spaltung erfahren.

3.3 Ermittlung der Halbwertszeit des humanen Cdc45-Proteins

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cdc45-Proteinmenge im Verlauf des Zellzyklus proliferierender Zellen unveränderlich blieb (Abschnitt 3.1). Diese Konstanz schließt allerdings einen erhöhten *turnover* des Proteins nicht aus. Obschon Angaben zur Halbwertszeit einiger humaner Replikationsfaktoren wie Cdc6 (Blanchard et al., 2002; Petersen et al., 2000), Mcm3 (Musahl et al., 1998) oder PCNA (Bravo & Macdonald-Bravo, 1987) verfügbar waren, fehlte diese wichtige Information bisher für den essentiellen Replikationsfaktor Cdc45. Zur Klärung dieses Punktes wurden zwei verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt (Abschnitt 2.9).

Einerseits wurden HeLa S3- und T98G-Zellen mit Cycloheximid inkubiert, um die gesamte Proteinsynthese zu blockieren und die Reduktion des Cdc45-Signals über die Zeit zu detektieren (Abschnitt 2.9.1). Andererseits wurde neusynthetisiertes Cdc45 in HeLa S3-Zellen durch den Einbau radioaktiver Aminosäuren markiert und die Abnahme der Radioaktivität über einen bestimmten Zeitraum verfolgt (Abschnitt 2.9.2). Die Halbwertszeit eines Proteins ist definiert als die Zeit, in der die Proteinmenge auf 50% des Ausgangswertes reduziert wird (Zhou, 2004).

Die Auswertung mehrerer unabhängiger Cycloheximid-Versuche ergab eine Halbwertszeit von 36h-48h für endogenes Cdc45-Protein in HeLa S3- (Abbildungen 22A und 22B) und T98G-Zellen (Daten nicht gezeigt). Da durch die Cycloheximid-Gabe die Gesamtproteinsynthese gehemmt wurde und damit auch die Stabilität und Menge an proteolytischen Enzymen beeinflusst war, reflektiert die ermittelte Halbwertszeit des Cdc45-Proteins möglicherweise nicht den *turnover* unter normalen physiologischen Bedingungen (Zhou, 2004).

Deshalb wurde unter optimalen Wachstumsbedingungen eine radioaktive *pulse-chase*-Markierung der neu gebildeten Proteine in HeLa S3-Zellen durchgeführt und Cdc45 anschließend durch Immunpräzipitation isoliert (Abschnitt 2.9.2). Anhand des Immunblots konnte davon ausgegangen werden, dass die Präzipitate etwa gleiche Mengen Cdc45-Protein enthielten (Abbildung 22C, oben). Deutlich sichtbar war allerdings die schnelle Reduktion des [³⁵S]-Cdc45-Autoradiographiesignals (Abbildung 22C, unten). Die Quantifizierung zeigte, dass das radioaktive Cdc45-Signal reproduzierbar nach 12h bei etwa 40% lag (Abbildungen 22C und 22D). Folglich beträgt die Halbwertszeit für humanes Cdc45-Protein ungefähr 10h-12h.

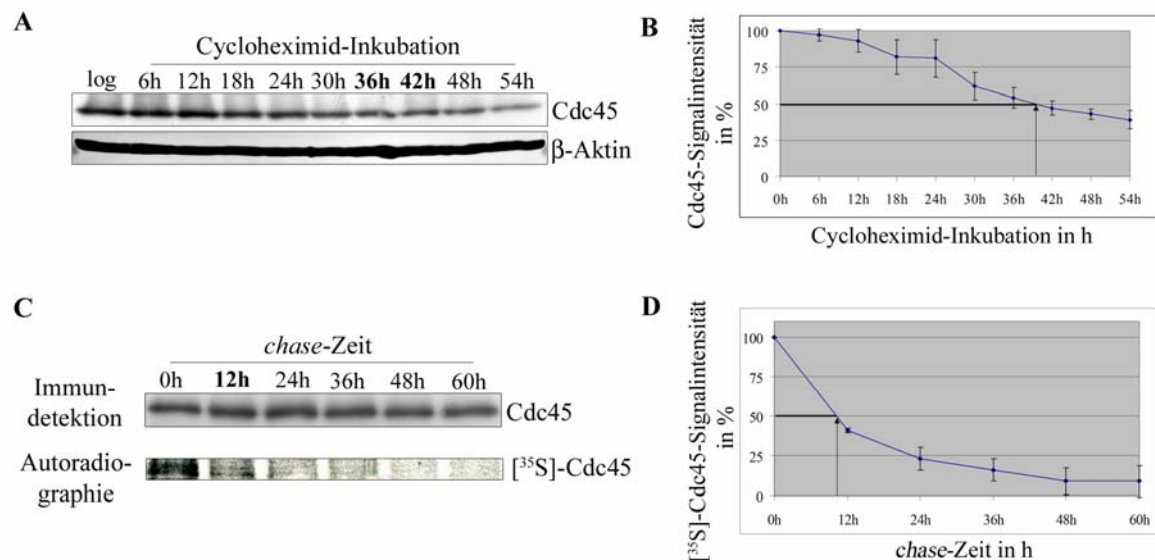


Abbildung 22: Bestimmung der Halbwertszeit des humanen Cdc45-Proteins durch Cycloheximid-Inkubation bzw. [³⁵S]-Methionin-Cystein-Markierung

- A** HeLa S3-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Cycloheximid inkubiert, um die Proteinsynthese zu inhibieren. Nach Ernte der Zellen wurden Ganzzelextrakte präpariert, je Zeitpunkt Extrakt von 500.000 Zellen in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis des Cdc45 erfolgte immunchemisch mit Hilfe der ECL-Technik.
- B** Graphische Darstellung der quantifizierten Cdc45-Signalintensitäten unabhängiger Cycloheximid-Inkubationen.
- C** HeLa S3-Zellen wurden für 4h in Medium mit [³⁵S]-Methionin-Cystein markiert (*pulse*) und danach in Medium mit unmarkiertem 5 mM Methionin und 5 mM Cystein kultiviert (*chase*). Im Rhythmus von 12h wurden Proben gesammelt, Ganzzelextrakte präpariert, Cdc45 mit einem monospezifischen Antikörper immunpräzipitiert und nach Auftrennung im 10%igen SDS-Polyacrylamidgel und Transfer auf eine PVDF-Membran immunchemisch und autoradiographisch detektiert.
- D** Quantifizierung der [³⁵S]-Cdc45-Signalintensitäten unabhängiger *pulse-chase*-Experimente.

Demzufolge ist endogenes Cdc45 ähnlich wie Mcm3 oder PCNA ein stabiles Protein in humanen Kulturzellen.

3.4 Bestimmung der Cdc45-Molekülzahl in humanen Zellen

Daten aus *Xenopus laevis* verdeutlichten die signifikant geringere Abundanz des Cdc45-Proteins im Vergleich zu Mcm-Proteinen (Edwards et al., 2002; Mahbubani et al., 1997). Ausgehend davon wurde die Hypothese formuliert, dass Cdc45 der limitierende Faktor für die Initiation der chromosomalen Replikation in Eukaryoten sein könnte (Dolan et al., 2004; Forsburg, 2004).

Angaben zur Molekülzahl humaner Replikationsfaktoren waren nur für Mcm2 (Todorov et al., 1995), Mcm3 (Burkhart et al., 1995) sowie für Cdt1 und Geminin (Xouri et al., 2004) verfügbar. Deshalb sollte die Molekülzahl für Cdc45 in humanen Kulturzellen bestimmt werden. Als erstes musste rekombinantes humanes Cdc45-Protein in High Five™-Insektenzellen exprimiert und aufgereinigt werden (Abschnitt 2.10). Zur Charakterisierung der Spezifität des Antikörpers C45-3G10 wurden Ganzzelextrakte aus HeLa S3- und T98G-Zellen neben gereinigtem humanem His₆-Cdc45 aufgetragen (Bauerschmidt et al., 2007) (Abbildung 23A). Weiterhin wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt, um die Lokalisation des rekombinant exprimierten Cdc45-Proteins zu bestimmen und die Reinigungsstrategie entsprechend zu adaptieren (Abschnitt 2.10 und Abbildung 23B).

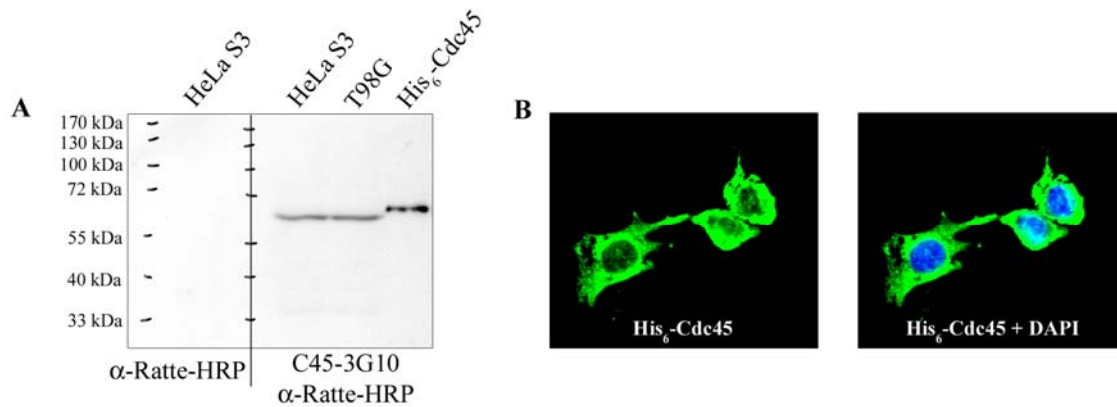


Abbildung 23: Expression des rekombinanten humanen His₆-Cdc45-Proteins in High Five™-Insektenzellen

Humanes Cdc45 wurde als His₆-Cdc45 in High Five™-Insektenzellen für 48h exprimiert und über eine Co-Talon™-Affinitätschromatographie gereinigt.

- A Nachweis der Spezifität des monoklonalen Cdc45-spezifischen Antikörpers C45-3G10. Auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel wurde je 75 µg Ganzzelleextrakt von proliferierenden HeLa S3- und T98G-Zellen sowie 1 ng eines His₆-Cdc45-Eluats aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran vertikal geschnitten und die linke Hälfte mit einem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper inkubiert. Die rechte Membranhälfte wurde mit dem primären Cdc45-spezifischen Antikörper und dem entsprechenden sekundären HRP-gekoppelten Antikörper behandelt.
- B Nachweis der zytoplasmatischen Expression des humanen His₆-Cdc45-Proteins in High Five™-Insektenzellen. Die Zellen wuchsen auf beschichteten Objektträgern und wurden nach 48 stündiger Expression des rekombinanten Proteins fixiert. Nach Inkubation mit den primären und sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern wurde die Lokalisation des His₆-Cdc45 (in grün) mikroskopisch dargestellt (20x Vergrößerung). Das blaue Signal zeigt den DAPI-gefärbten Zellkern.

Zur Bestimmung der Proteinmenge des His₆-Cdc45 im Eluat wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel parallel definierte Mengen BSA aufgetragen und das Gel mit Coomassie gefärbt (Abschnitt 2.18). Die Verwendung einer kolloidalen Coomassie-Färbelösung erlaubte den Nachweis sehr geringer Proteinmengen, wobei laut Herstellerangaben (Fermentas) eine Sensitivität vergleichbar der Silberfärbung erreicht werden konnte. Die massenspektrometrische Analyse (N. Baum, FLI Jena) ergab, dass die mit einem Stern gekennzeichnete Bande humanes His₆-Cdc45 war (Abbildung 24A). Die Bande oberhalb des Cdc45 wurde als Hitzeschockprotein 70 und die Doppelbande unterhalb als Zytokeratin 1 und Zytokeratin 9 identifiziert.

Die Quantifizierung der Proteinbanden des Coomassie-Gels zeigte, dass das Signal für His₆-Cdc45 in 4 µl des Eluats in etwa dem Signal von 25 ng BSA entsprach (Abbildung 24A). Nun wurden definierte Mengen des rekombinanten His₆-Cdc45-Proteins gemeinsam mit Ganzzelleextrakten aus 200.000 HeLa S3- bzw. T98G-Zellen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die immunchemische Detektion des Cdc45-Proteins und die anschließende Quantifizierung ergaben, dass die Signale von 200.000 Zellen dem für 1 ng His₆-Cdc45 entsprachen (Abbildung 24B). Diese Angabe wurde durch mehrere unabhängige Experimente verifiziert.

Unter Berücksichtigung der in Abbildung 24C dargestellten Gleichung zur Gewicht-Stoffmengen-Konversion und der Kenntnis des Molekulargewichtes des humanen Cdc45-Proteins (65,5 kDa) konnte eine Cdc45-Molekülzahl von 45.000 je humaner Zelle berechnet werden. Damit beträgt das Verhältnis von extrahierbaren Mcm3- (Burkhart et al., 1995) zu Cdc45-Molekülen 22:1 und auch in Säugern ist Cdc45 im Vergleich zu Mcms weniger abundant.

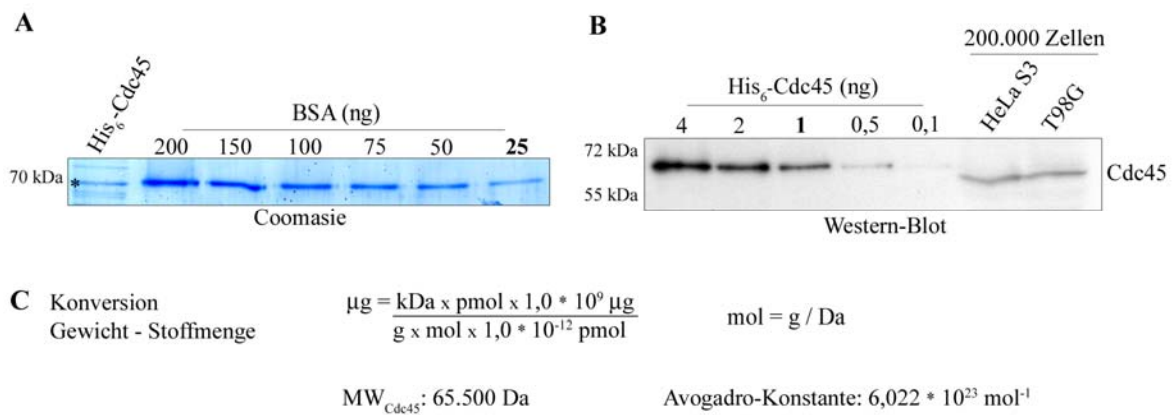


Abbildung 24: Kalkulation der Cdc45-Molekülzahl je HeLa S3- bzw. T98G-Zelle

- A** Titration des His₆-Cdc45-Eluats gegen eine BSA-Verdünnungsreihe. 4 µl des His₆-Cdc45-Eluats wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel zusammen mit verschiedenen Konzentrationen von BSA aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung des Gels mit kolloidaler Coomassie-Lösung wurden die Signale mit dem Programm Phoretix 1D Advanced quantifiziert. Das Signal des His₆-Cdc45-Proteins (mit einem Stern gekennzeichnet) entsprach dem Signal von 25 ng BSA.
- B** Titration definierter Mengen His₆-Cdc45-Protein gegen Ganzzellextrakt logarithmisch wachsender Zellen. Auftragung von Ganzzellextrakten von 200.000 HeLa S3- bzw. T98G-Zellen zusammen mit verschiedenen Konzentrationen des rekombinanten His₆-Cdc45-Proteins auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel, elektrophoretische Auftrennung und Transfer auf eine PVDF-Membran. Immunologischer Nachweis des Cdc45 mit der ECL-Technik sowie Quantifizierung der Banden mit dem Programm Phoretix 1D Advanced. Das Signal für Cdc45 in HeLa S3- und T98G-Zellen entsprach dem Signal von 1 ng His₆-Cdc45.
- C** Konversion Gewicht-Stoffmenge und Berechnung der Cdc45-Molekülzahl je Zelle. Die Cdc45-Signale im Western-Blot (B) für Extrakte von 200.000 HeLa S3- bzw. T98G-Zellen entsprachen dem Signal von 1 ng His₆-Cdc45. Unter Einbeziehung des Molekulargewichtes des humanen Cdc45-Proteins und der Avogadro-Konstante ergab sich eine ungefähre Cdc45-Molekülzahl von 45.000 je HeLa S3- bzw. T98G-Zelle.

3.5 Expression des Cdc45-Proteins in humanen Primär- und Tumorzelllinien

Zum Vergleich der Expression des humanen Cdc45-Proteins wurden die logarithmisch wachsenden Primärzelllinien MRC-5, WI-38 und HEF in niedrigen Passagen verwendet (Abbildung 25). Die Tumorzelllinien wurden so ausgewählt, dass repräsentative Vertreter maligner epithelialer Tumoren (Karzinome), mesenchymaler Tumoren (Sarkome), neuroektodermaler Tumoren (Glioblastom) sowie maligner Tumoren des hämatopoetischen Systems (Leukämien) berücksichtigt wurden (Abbildung 25). Außerdem konnten periphere, unstimulierte Lymphozyten durch Ficoll®-Zentrifugation aus dem Frischblut eines gesunden Probanden gewonnen werden (Abbildung 25).

Die Auswertung der Western-Blot-Signale zeigte deutlich, dass das humane Cdc45-Protein in signifikant höherer Menge in Tumorzelllinien im Vergleich zu Primärzellen vorhanden war (Abbildungen 25A und 25B). Prominent war darüber hinaus die starke Expression des Cdc45-Proteins in den hier analysierten Leukämie-Zelllinien (Abbildung 25B, Bahnen 4-8). In peripheren Lymphozyten, die aus dem Blut eines gesunden Spenders isoliert wurden, konnte demgegenüber kein Cdc45-Protein nachgewiesen werden (Abbildung 25B, Bahn 1). Dieses Ergebnis korrelierte mit den Tatsachen, dass sich unstimulierte periphere Lymphozyten in der G₀-Phase befinden (Lea et al., 2003) und sowohl die Cdc45-mRNA (Arata et al., 2000) als auch das -Protein (Arata et al., 2000) (Abbildungen 12 und 14) in quieszenten Zellen nicht nachweisbar waren.

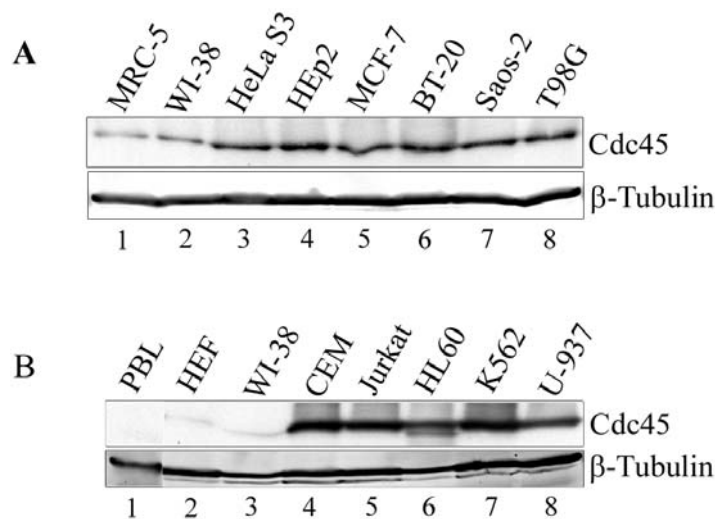


Abbildung 25: Humanes Cdc45-Protein in Primär- und Tumorzelllinien

Western-Blot-Analyse der Cdc45-Proteinmenge in Ganzzelextrakten logarithmisch wachsender Primärzelllinien und Tumorzelllinien aus verschiedenen Ursprungsgeweben. Nach Präparation von Ganzzelextrakten wurde 75 µg Extrakt je Bahn auf 10%ige SDS-Polyacrylamidgels aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Cdc45 und β-Tubulin wurden immunchemisch detektiert.

- A Auftragung von links nach rechts: MRC-5 (normale embryonale Lungenfibroblasten), WI-38 (normale embryonale Lungenfibroblasten), HeLa S3 (Cervixkarzinom), HEp2 (Cervixkarzinom), MCF-7 (Mammakarzinom), BT-20 (Mammakarzinom), Saos-2 (Osteosarkom), T98G (Glioblastom).
- B Auftragung von links nach rechts: PBL (primäre periphere Blut-Lymphozyten), HEF (normale embryonale Lungenfibroblasten), WI-38 (normale embryonale Lungenfibroblasten), CEM (akute lymphoblastische Leukämie), Jurkat (akute T-Zell-Leukämie), HL60 (akute promyelozytische Leukämie), K562 (chronisch myeloische Leukämie), U-937 (histiozytische Leukämie).

Für HL60-Zellen wurde das Cdc45-Protein als charakteristische Doppelbande detektiert (Abbildungen 17B und 25B, Bahn 6 sowie Abschnitte 4.6 und 4.7a). In allen anderen Zelllinien war immer nur eine Cdc45-Bande immunchemisch nachweisbar (Abbildung 25).

3.6 Immunhistochemischer Nachweis des Cdc45-Proteins in humanen Geweben

Die Expression der Mcm2-7-Proteine wurde für alle Zellzyklusphasen proliferierender Zellen bestätigt (Fujita et al., 1996; Hendrickson et al., 1996; Izumi et al., 2001; Schulte et al., 1996; Stoeber et al., 2001; Todorov et al., 1995; Tsuruga et al., 1997; Wohlschlegel et al., 2000). Allerdings konnte festgestellt werden, dass Mcm-Untereinheiten in Zellen, die den Zyklus temporär oder permanent verlassen hatten, nicht oder nur in geringem Maße exprimiert werden (Madine et al., 2000; Musahl et al., 1998; Stoeber et al., 2001). Mcms wurden entsprechend ihrer proliferationsassoziierten Expression als neue Biomarker für immunhistochemische Anwendungen ausgewiesen und intensiv an diversen Tumorentitäten ausgetestet (Abschnitt 4.6).

Ein Proliferationsmarker sollte definitionsgemäß folgende Eigenschaften besitzen: das Protein sollte in allen Zellzyklusphasen proliferierender Zellen exprimiert werden, nicht aber in nicht-prolierierenden Zellen (Scholzen & Gerdes, 2000). Daten der hier vorliegenden Arbeit verdeutlichten, dass humanes Cdc45 diese Kriterien erfüllen kann (Abschnitte 3.1 bis 3.2.4). Deshalb war es interessant zu überprüfen, ob Cdc45 neben den etablierten Markern Ki-67 und PCNA bzw. Mcms als neuer Proliferationsmarker in der Tumorphathologie Verwendung finden könnte.

Der für Immundetektion, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz (Bauerschmidt et al., 2007; Pollok et al., 2003) sowie für Chromatin-Immunpräzipitation (Liu et al., 2006) sehr gut einsetzbare monoklonale Antikörper C45-3G10 sollte auf seine Verwendbarkeit für immunhistochemische Detektionen getestet werden. Dazu wurde eine Kooperation mit Dr. J. Sänger von der Pathologie in Bad Berka initiiert. Die Antikörper-Applikation erfolgte an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Schnitten aus Normal- und Tumorgewebe. Die Zellkerne konnten durch eine Gegenfärbung mit Hematoxylin sichtbar gemacht werden. Cdc45, PCNA und Ki-67 wurden in den entsprechenden humanen Gewebeschnitten mit der *avidin biotin complex*-Methode und 3,3'-Diaminobenzamidin als chromogenem Substrat in braun-roter Färbung sichtbar gemacht (Abschnitt 2.20).

Für normales Hautgewebe waren die Signale für Cdc45 und die der etablierten Proliferationsmarker PCNA und Ki-67 sehr ähnlich (Abbildung 26A). Es wurden vereinzelt proliferierende Zellen der epidermalen Basalregion gefärbt, aber auch Zellen der darunterliegenden Hautschichten. Das Cdc45-Protein zeigte eine vornehmlich nukleäre Lokalisation. Darüber hinaus konnte mit dem Cdc45-spezifischen Antikörper ein schwaches zytoplasmatisches Signal detektiert werden, welches mit der epithelialen Basalregion assoziiert war.

Das invasiv-lobuläre Mammakarzinom zeichnete sich durch nicht-kohäsive Zellen aus, die einzeln verstreut oder in Zellsträngen vorlagen, was durch den Verlust von E-Cadherin begründbar war (persönliche Kommunikation J. Sänger). Das Cdc45-Signal entsprach bei dieser speziellen Tumorentität annähernd dem PCNA-Signal (Abbildung 26B). Obwohl der Hauptanteil der malignen Zellpopulation Cdc45- bzw. PCNA-positiv war, wurden auch Zellen im benachbarten Stroma angefärbt. Vermutlich handelte es sich hierbei um aktivierte Lymphozyten, Fibroblasten oder Endothelzellen. Cdc45 wurde bei dieser Tumorart auch primär im Zellkern gefunden (Abbildungen 26B und 26C, links). Das Ki-67-Protein konnte nur bei sehr wenigen tumorassoziierten Zellen nachgewiesen werden. Möglicherweise handelte es sich beim vorliegenden Preparat um einen Tumor, bei dem ein Großteil der proliferierenden Population in der G₁-Phase war. Ki-67 ist ein kurzlebiges Protein mit einer Halbwertszeit von 20-30 min (Bruno et al., 1992; Heidebrecht et al., 1996) und wird vornehmlich in der S-, G₂- und M-Phase exprimiert (Gerdes et al., 1984; Scholzen & Gerdes, 2000). Bezüglich dieser Eigenschaften könnten wachsende Tumorzellen, die länger in der G₁-Phase verweilen (Lei, 2005), als Ki-67-negativ detektiert werden. Auch wurde beschrieben, dass mitunter Ki-67 in S-Phase-Zellen nicht nachweisbar war und somit proliferierende Zellen mit diesem Marker nicht angezeigt werden konnten (Coleman et al., 2006). Das Ki-67-Antigen zeigte auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber chemischer Denaturierung (Brown & Gatter, 1990; van Dierendonck et al., 1991) und wäre eventuell nach Hitzebehandlung, die eine Steigerung der Antigenität bewirken sollte (Abschnitt 2.20), labil.

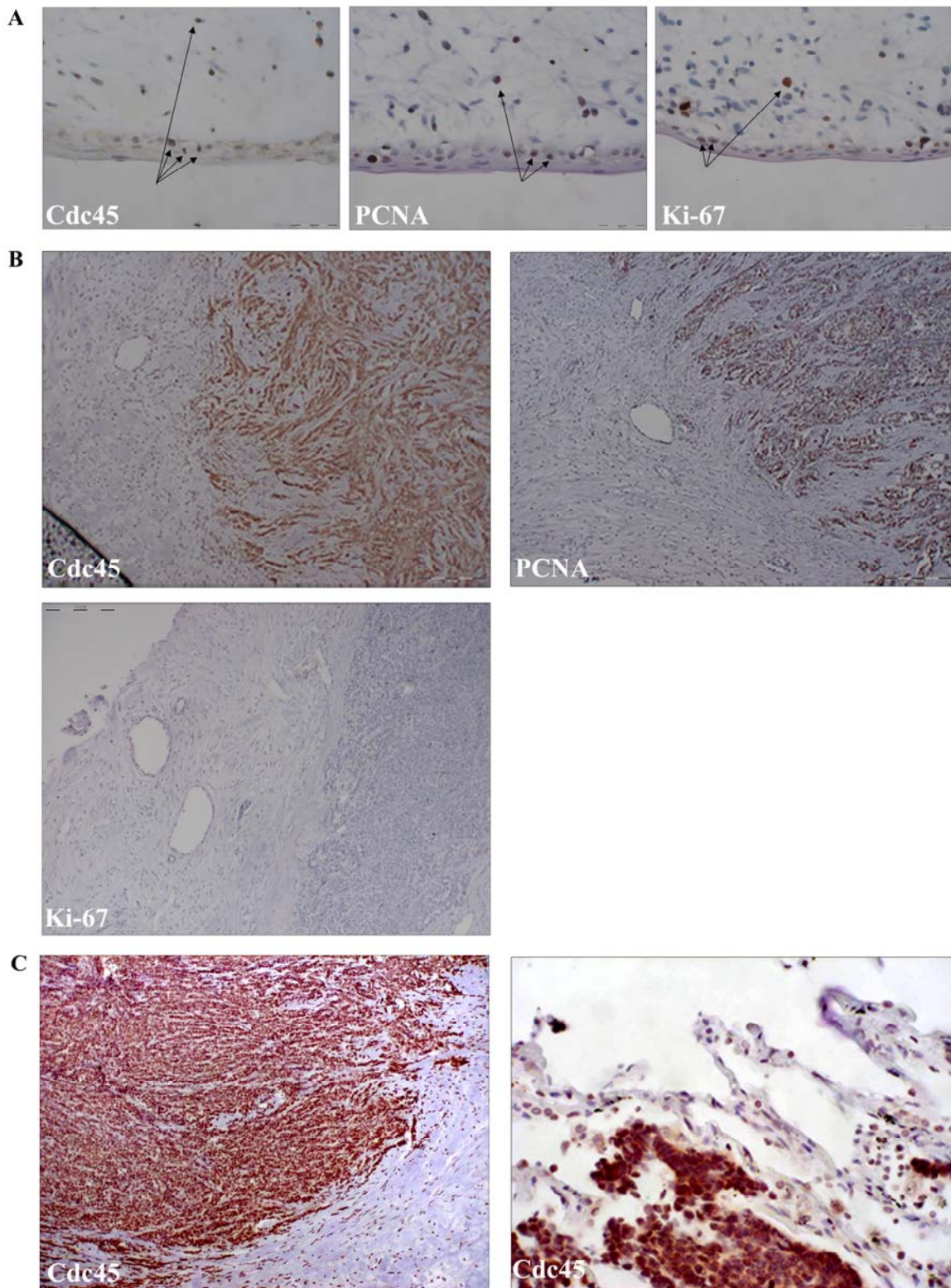


Abbildung 26: Immunhistochemischer Nachweis des Cdc45-Proteins in humanen Gewebeschnitten

Die Proteine Cdc45, PCNA und Ki-67 wurden immunhistochemisch in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten seriellen Schnitten von normalem und malignem Gewebe durch die *avidin biotin complex*-Methode detektiert (braun-rote Färbung).

- A Cdc45, PCNA und Ki-67 in parallelen Schnitten eines normalen Hautgewebes. Kernassoziierte Signale sind durch Pfeile markiert (Größenmarker 50 μ m: 40x Objektiv + 2,5x Projektiv).
- B Cdc45, PCNA und Ki-67 in parallelen Schnitten eines invasiv-lobulären Mammakarzinom-Gewebes (Größenmarker 200 μ m: 10x Objektiv + 2,5x Projektiv).
- C Cdc45 in invasiv-lobulärem Mammakarzinom-Gewebe (links; 10x Objektiv + 2,5x Projektiv) und in kleinzelligem Bronchialkarzinom-Gewebe (rechts; 40x Objektiv + 2,5x Projektiv).

Es wäre durchaus interessant, an parallelen Gewebeschnitten von invasiv-lobulären Mammakarzinomen Ki-67, Cdc45, Mcms sowie Geminin immunhistochemisch vergleichend zu färben. Humanes Geminin-Protein konnte in der G₁-Phase nicht nachgewiesen werden (McGarry & Kirschner, 1998; Wohlschlegel et al., 2000). Hingegen sind Cdc45 und Mcms in allen Zellzyklusphasen proliferierender humaner Zellen anwesend (Abschnitt 3.1).

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist ein aggressiver und schnell proliferierender Tumor mit neuroendokriner Differenzierung (persönliche Kommunikation J. Sängers). Cdc45 konnte auch hier nukleär und assoziiert mit der malignen Zellpopulation nachgewiesen werden (Abbildung 26C, rechts).

Die hier vorgestellten Daten belegen die gute Verwendbarkeit des Cdc45-spezifischen Antikörpers C45-3G10 für immunhistochemische Applikationen. Erste Färbungen an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Mamma- und Bronchialkarzinompräparaten von Patienten zeigten die Assoziation des Cdc45-Signals mit proliferierenden malignen Zellen (Abbildung 26). Ob die Detektion von Cdc45 als putativer neuer Proliferationsmarker in der pathologischen Diagnostik hilfreich sein könnte, muss in weiterführenden Studien geklärt werden. Kooperationspartner in Bad Berka, Lübeck und Galway versuchen momentan, Cdc45 neben den routinemäßig verwendeten Markern Ki-67 und PCNA an weiteren Tumorentitäten nachzuweisen (Abschnitt 4.7d).

4 Diskussion

Der eukaryotische Replikationsfaktor Cdc45 ist evolutionär konserviert (Abschnitt 1.3.1) und essentiell für die normale embryonale Entwicklung (Yoshida et al., 2001). Cdc45 wird als limitierender Faktor für die Initiation der DNA-Replikation diskutiert (Dolan et al., 2004; Forsburg, 2004) und ist darüber hinaus auch in den Elongationsprozess eingebunden (Aparicio et al., 1999; Bauerschmidt et al., 2007).

Die vorliegende Arbeit ermöglichte die genauere zellbiologische und biochemische Charakterisierung des Cdc45-Proteins in humanen Zellen. Es wurden insbesondere folgende Punkte untersucht: Expression und subzelluläre Lokalisation in proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen, posttranslationale Modifikationen, Verhalten des Proteins in apoptotischen Zellen sowie Bestimmung der Halbwertszeit und der Molekülzahl. Ferner wurde geprüft, ob Cdc45 als neuer Proliferationsmarker in der pathologischen Diagnostik Verwendung finden könnte.

4.1 Cdc45 ist ein proliferationsassoziiertes Antigen

Humane Replikationsfaktoren zeigen ein divergentes Verhalten hinsichtlich ihrer zellzyklusspezifischen Proteinexpression. Einerseits wurden für Cdc6 (Mendez & Stillman, 2000; Petersen et al., 2000), Cdt1 (Nishitani et al., 2004; Nishitani et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000), Mcm6 (Tsuruga et al., 1997) und Geminin (McGarry & Kirschner, 1998; Wohlschlegel et al., 2000) charakteristische Fluktuationen der Proteinmengen im Zellzyklus beschrieben. Andererseits konnten keine zellzyklusspezifischen Veränderungen in den Proteinmengen von Mcm2 (Todorov et al., 1995; Tsuruga et al., 1997), Mcm3 (Mendez & Stillman, 2000; Tsuruga et al., 1997), Mcm4 (Mendez & Stillman, 2000), Mcm5 (Mendez & Stillman, 2000; Stoeber et al., 2001), Mcm7 (Fujita et al., 1996; Izumi et al., 2001; Schulte et al., 1996) und des Orc2 (Mendez & Stillman, 2000; Ohta et al., 2003; Stoeber et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000) (Abbildungen 10B und 11B) nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um A. Dutta zeigte ein Ansteigen der Cdc45-mRNA-Menge am G₁/S-Übergang, jedoch die Unveränderlichkeit der Cdc45-Proteinmenge im Zellzyklus humaner HeLa-Zellen (Saha et al., 1998b).

In Rahmen des Dissertationsprojektes wurde die unveränderliche Cdc45-Proteinmenge in den einzelnen Zellzyklusphasen proliferierender humaner HeLa S3-Zellen verifiziert (Saha et al., 1998b) (Abschnitt 3.1) sowie darüber hinaus zusätzlich für humane T98G-Zellen demonstriert (Abschnitt 3.1). Immunfluoreszenzstudien zeigten jedoch signifikante Veränderungen der subzellulären Lokalisation des humanen Cdc45-Proteins (Abschnitt 3.1). In der Interphase war Cdc45 exklusiv im Zellkern zu finden, wohingegen in mitotischen Zellen eine gleichmäßige Verteilung in der gesamten Zelle auftrat. Bedeutend war ferner die Änderung des eher diffusen Cdc45-Signals in G₁-, G₂- und M-Phase-Zellen zu distinkten Spots in replizierenden Zellen. Diese Cdc45-Ansammlungen in der S-Phase co-lokalisierten partiell mit BrdU-Signalen und sprachen für die räumliche Nähe des essentiellen Replikationsfaktors Cdc45 und aktiver DNA-Replikation. Durch Co-Immunpräzipitationen konnten der Mcm2-7-Komplex, der GINS-Komplex und die DNA-Polymerasen δ und ϵ als Interaktionspartner des humanen Cdc45 in replizierenden Zellen identifiziert werden (Bauerschmidt et al., 2007). Daher wurde die Hypothese formuliert, dass Cdc45 eine essentielle Funktion in der Elongationsphase erfüllt und

möglicherweise als Verbindungsprotein die Mcm2-7-Helikase mit den elongativen DNA-Polymerasen verknüpft (Bauerschmidt et al., 2007) (Abschnitt 1.3.9).

In quieszenten murinen und humanen Fibroblasten konnte weder die Cdc6-mRNA noch das -Protein detektiert werden (Stoeber et al., 1998; Stoeber et al., 2001; Williams et al., 1998; Williams et al., 1997; Yan et al., 1998) (Abschnitt 3.2.1). Auch in murinen oder humanen G₀-Zellen wurden die Transkripte bzw. Proteine des Mcm2-7-Komplexes nicht mehr gefunden (Madine et al., 2000; Stoeber et al., 2001; Tsuruga et al., 1997; Williams et al., 1998) (Abschnitt 3.2.1). Aus der Literatur war bekannt, dass in Maus-Fibroblasten keine Cdc45-mRNA und kein -Protein nachgewiesen werden konnte (Arata et al., 2000). Das humane Cdc45-Transkript war zudem in Geweben mit geringer Proliferationsrate wie dem Gehirn und der Leber nicht detektierbar (Shaikh et al., 1999). Die hier gezeigten Studien belegen nun erstmals für humane quieszente Zellen die vollständige Abwesenheit des Cdc45-Proteins (Abschnitt 3.2.1).

Weiterhin wurde für seneszente Zellen die Abwesenheit des Mcm7- und des Cdc45-Proteins (Abschnitt 3.2.3) zusätzlich zu der schon dokumentierten Abwesenheit der Replikationsproteine Cdc6, Mcm2, Mcm3 und Mcm5 bewiesen (Chen et al., 2004; Stoeber et al., 2001) (Abschnitt 3.2.3).

Der Verlust des Cdc6-Proteins konnte in verschiedenen *in vitro*-Differenzierungsmodellen gezeigt werden: in K562-Zellen, die sich zu Megakaryozyten (Bermejo et al., 2002) (Abschnitt 3.2.4) sowie in Caco-2-Zellen, die sich zu Enterozyten ausdifferenziert hatten (Bravou et al., 2005). Allerdings persistierte das Cdc6-Protein in erhöhter Menge in terminal differenzierten HL60-Monozyten/Makrophagen (Abschnitt 3.2.4). Unter Umständen könnte Cdc6 zusätzlich zu seiner essentiellen Funktion in der DNA-Replikation speziell in einigen differenzierten Zellarten oder Geweben weitere Aufgaben übernehmen. In *Saccharomyces cerevisiae* wurde Cdc6 beispielsweise für transkriptionelles *silencing* subtelomerer Chromatinbereiche benötigt (Rehman et al., 2006). Im letzten Jahr wurde gezeigt, dass Cdc6 auch in die Stilllegung des *INK4A*-Locus in humanen Zellen eingebunden ist (Gonzalez et al., 2006; Gonzalez & Serrano, 2006). Möglicherweise ist Cdc6 in Monozyten/Makrophagen durch diese repressive Funktion an der differentiellen Genexpression beteiligt. Eine Reduktion der Proteinmengen von Mcm2, Mcm3 und Mcm7 konnte ebenfalls während des Differenzierungsprozesses in HL60- und K562-Zellen gefunden werden (Musahl et al., 1998; Schulte et al., 1996) (Abschnitt 3.2.4). Auch in terminal differenzierten Zellen am oberen Ende von Kolon-Krypten war Mcm2 immunhistochemisch nicht detektierbar (Blow & Hodgson, 2002; Stoeber et al., 2001). Ein Teilprojekt der vorliegenden Dissertation klärte nun auf, dass das Cdc45-Protein weder in terminal differenzierten HL60-Monozyten/Makrophagen noch in K562-Megakaryozyten vorhanden war (Abschnitt 3.2.4).

In Gegensatz zur Abwesenheit der Replikationsfaktors Cdc45 findet sich das Orc2-Protein weiterhin in unveränderter Menge in quieszenten (Stoeber et al., 1998; Stoeber et al., 2001) (Abschnitt 3.2.1), seneszenten (Stoeber et al., 2001) (Abschnitt 3.2.3) und terminal differenzierten Zellen (Musahl et al., 1998) (Abschnitt 3.2.4). Auch in Geweben ohne signifikante Proliferation wurde die Expression von Orc2 und Orc5 nachgewiesen (Quintana et al., 1998; Takahara et al., 1996). Der ORC-Komplex scheint also in nicht-proliferierenden

Zellen weitere Funktionen über die DNA-Replikation hinaus zu übernehmen. Bisher ist bekannt, dass ORC in *Saccharomyces cerevisiae* mit transkriptionellem *silencing* (Bose et al., 2004; Dillin & Rine, 1997; Ehrenhofer-Murray et al., 1995; Fox et al., 1997; Hsu et al., 2005; Rehman et al., 2006; Suter et al., 2004) bzw. der Kohäsion der Schwesterchromatiden (Shimada & Gasser, 2007; Suter et al., 2004) in Verbindung gebracht wird. In *Drosophila melanogaster* führten Mutationen in ORC-Genen zu Chromosomenbrüchen (Loupert et al., 2000; Pflumm & Botchan, 2001). In murinen und humanen Zellen co-lokalisierten ORC-Untereinheiten während des gesamten Zellzyklus mit Zentrosomen, was auf eine Einbindung in Zytokineseprozesse hindeutet (Prasanth et al., 2004; Prasanth et al., 2002; Stuermer et al., 2007). Darüber hinaus wurden in Fruchtfliegen-Embryonen Interaktionen zwischen ORC und dem *heterochromatin binding protein 1* (HP1) detektiert (Huang et al., 1998; Pak et al., 1997). Daraus wurde geschlossen, dass ORC die Ausbildung oder Erhaltung des Heterochromatins beeinflusst.

Auch persistierte das Mcm10-Protein in fast unveränderten Mengen in quieszenten, seneszenten und differenzierten humanen Zellen (Abschnitte 3.2.1 bis 3.2.4). Bislang wurde Mcm10 ausschließlich in der Bäckerhefe mit der Stilllegung von Genorten assoziiert (Douglas et al., 2005; Liachko & Tye, 2005). Ob Mcm10 in höheren Eukaryoten ähnlich dem ORC-Komplex noch andere Funktionen hat und welche Aufgaben es speziell in nicht-proliferierenden Zellen übernimmt, bleibt zu klären.

Auf Grundlage der Daten lässt sich abschätzen, dass eine positive Korrelation zwischen der Cdc45-Expression und zellulärer Proliferation besteht. Oder anders ausgedrückt, Cdc45 ist ein proliferationsassoziiertes Antigen. Wie bereits in Abschnitt 1.3 erläutert, ist Cdc45 in zyklisierenden Zellen für die Initiations- und Elongationsphase der Replikation essentiell. Für *Saccharomyces cerevisiae* wurde beschrieben, dass Cdc45 auch in transkriptionelles *silencing* eingebunden sein kann (Ehrenhofer-Murray et al., 1999; Rehman et al., 2006). Es wurde über eine möglicherweise stattfindende Interaktion mit anderen Proteinen spekuliert, die für die Etablierung des stillgelegten Chromatins nach Passage der Replikationsgabel verantwortlich sind (Ehrenhofer-Murray et al., 1999). Auch konnte Cdc45 mit Chromatinkondensation (Christensen & Tye, 2003) und -dekondensation (Alexandrow & Hamlin, 2005) in Verbindung gebracht werden. Nichtsdestotrotz scheint Cdc45 in nicht-proliferierenden Zellen, anders als ORC oder Mcm10, keine weiteren Aufgaben zu besitzen.

Wenn Zellen temporär oder permanent den mitotischen Teilungszyklus verlassen, wird die Initiation der DNA-Replikation auf mehreren Ebenen unterbunden. Erstens wird die Assemblierung des prä-replikativen Komplexes inhibiert, da essentielle Komponenten abwesend sind. Zweitens ist der für Initiation und Elongation wichtige Replikationsfaktor Cdc45 nicht vorhanden und damit kann der *origin* nicht „gefeuert“ werden. Drittens werden ebenso die replikativen DNA-Polymerasen α (Moore & Wang, 1994; Tuusa et al., 1995) und ϵ (Tuusa et al., 1995; Winter et al., 2000) sowie das akzessorische Protein RF-C (van der Kuip et al., 1999) in nicht-proliferierenden Zellen stark reduziert, um auch auf dem Niveau der DNA-Synthese regulierend eingreifen zu können. Damit wird sichergestellt, dass keine ungeplante Verdopplung der chromosomalen DNA stattfindet, wenn die Zellen ihre

Proliferation eingestellt haben. Treten Zellen nach mitogener Stimulation aus der G₀-Phase wieder in den Zellzyklus ein, erlangen sie ihre replikative Kompetenz ein paar Stunden vor Beginn der S-Phase zurück. Sowohl Komponenten des prä-replikativen Komplexes wie Cdc6, Cdt1 oder Mcm2-7 (Kingsbury et al., 2005; Tsuruga et al., 1997; Xouri et al., 2004; Yan et al., 1998) (Abschnitt 3.2.2), als auch die DNA-Polymerasen α und ϵ (Huang et al., 2001; Moore & Wang, 1994) (Abschnitt 3.2.2) werden nach Mitogenapplikation neu synthetisiert und akkumulieren in der G₁-Phase bzw. am G₁-/S-Übergang. Das Cdc45-Protein wird in murinen bzw. humanen Zellen nach Serumstimulation in der späten G₁-Phase *de novo* synthetisiert (Arata et al., 2000) (Abschnitt 3.2.2), was mit seiner Funktion in der Initiations- und Elongationsphase der DNA-Replikation konsistent ist (Abschnitt 1.3).

Die vollständige Abwesenheit des humanen Cdc45-Proteins in nicht-proliferierenden Zellen kann durch verschiedene Regulationen zustande gekommen sein. Zum einen könnten auf dem Niveau der Transkription Chromatinmodifikationen zur Stilllegung des CDC45-Gens geführt haben (Abschnitt 4.2). Denkbar wäre auch eine Beeinflussung der Stabilität der Cdc45-mRNA. Zum anderen könnte die Cdc45-Proteinmenge durch lysosomalen oder proteasomalen Abbau verringert worden sein (Abschnitt 4.3).

4.2 Transkriptionelles *silencing* E2F-regulierter Gene

E2F- und Myc-regulierte Genprodukte haben entscheidende Funktionen beim Übergang der Zellen von der G₁- in die S-Phase (Abschnitt 1.1.2). Bindesequenzen für Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie wurden in den Promotorbereichen einer Vielzahl von Replikationsfaktoren identifiziert (Tabelle 1). Die Expression E2F-regulierter Gene wird durch komplexe reversible Histonmodifikationen reguliert. Allgemeingültig lässt sich konstatieren, dass E2F-pRb-Assoziat Histonacetyltransferasen (HAT), Histondeacetylasen (HDAC), Histonmethyltransferasen (HMT) und Chromatin-Remodellierungs-Komplexe rekrutieren können (Brehm et al., 1998; Ferreira et al., 1998; Frolov & Dyson, 2004; Harbour & Dean, 2000; Nicolas et al., 2003; Nielsen et al., 2001; Rowland & Bernards, 2006; Trimarchi & Lees, 2002; Vandel et al., 2001).

Es existieren eine Reihe von Daten, die für eine E2F-regulierte Cdc45-Expression sprechen. So wurde ein Ansteigen der Cdc45-mRNA-Menge am G₁-/S-Übergang (Arata et al., 2000; Hardy, 1997; Owens et al., 1997; Saha et al., 1998b) in Übereinstimmung mit der Funktion des Proteins in der S-Phase gezeigt. In der Promotorregion der humanen CDC45-DNA wurde eine überlappende E2F-Bindestelle identifiziert (Arata et al., 2000). Auch konnten E2F-Sequenzen in den Promotoren der *Drosophila melanogaster* (Loebel et al., 2000) und *Arabidopsis thaliana* CDC45-DNA (Stevens et al., 2004) gefunden werden. Die Transkriptionsfaktoren E2F1-3 waren in der Lage, den E2F-Promotorbereich zu binden und die Cdc45-Expression in Ratten-Fibroblasten zu induzieren (Arata et al., 2000).

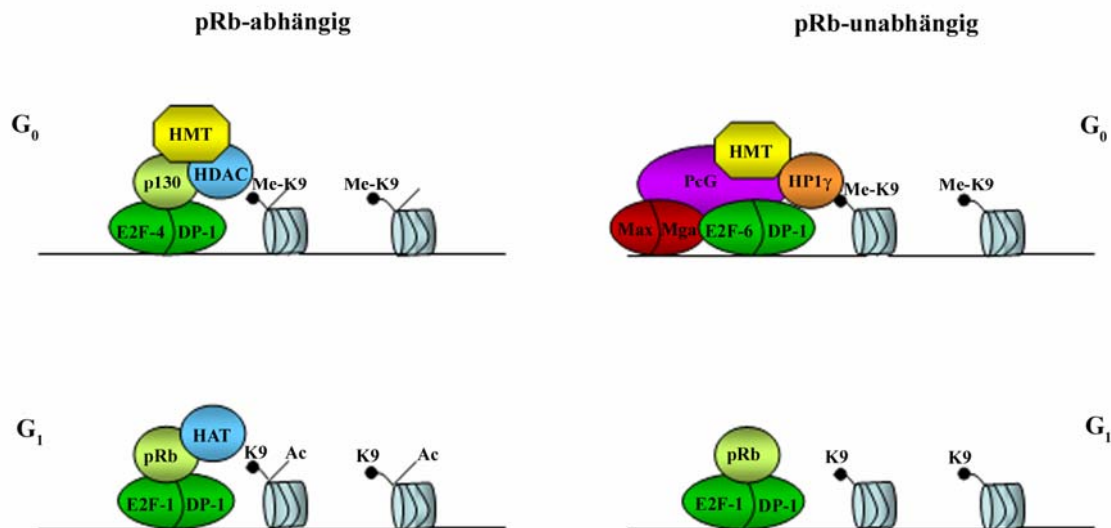


Abbildung 27: Transkriptionelles *silencing* E2F-regulierter Gene in quieszenten Zellen

In G₀-Zellen werden E2F-Loci durch Bindung der transkriptionellen Repressoren E2F-4 bzw. E2F-6 und entsprechender Co-Repressoren der pRb-Familie (p130) sowie durch Rekrutierung von Histondeacetylasen (HDAC), Histonmethyltransferasen (HMT), *polycomb-group* (PcG)-Proteinen und *heterochromatin binding protein 1 γ* (HP1γ) stillgelegt. Me-K9 entspricht methylierten Lysin 9-Resten des Histon H3, Ac entspricht acetylierten Histon-Resten (Histonacetyltransferase: HAT) und Max/Mga sind Mitglieder der Myc-Familie. Das transkriptionelle *silencing* kann zum einen pRb-abhängig, unter Einbeziehung des p130 (linke Grafik), oder zum anderen pRb-unabhängig (rechte Grafik) erfolgen. Die Abbildungen wurden auf Grundlage der Resultate von (Ferreira et al., 2001; La Thangue, 2002; Nicolas et al., 2003; Ogawa et al., 2002; Rayman et al., 2002; Takahashi et al., 2000) erstellt.

Weiterhin wurde gezeigt, dass in quieszenten Zellen weder die Cdc45-mRNA (Arata et al., 2000) noch in quieszenten, seneszenten und differenzierten Zellen das Cdc45-Protein detektiert werden konnte (Arata et al., 2000) (Abschnitte 3.2.1 bis 3.2.4). Veröffentlichungen der letzten Jahre belegen, dass E2F-Promotoren in nicht-proliferierenden Zellen stillgelegt sind. Die Abwesenheit des Cdc45-Proteins in diesen Zellen kann durch transkriptionelles *silencing* der E2F-Loci im CDC45-Promotor zustande gekommen sein.

Die Regulation von E2F-Promotoren in quieszenten Zellen wurde von mehreren Arbeitsgruppen intensiv untersucht und es werden sowohl pRb-abhängige als auch pRb-unabhängige Wege des transkriptionellen *silencings* beschrieben (Abbildung 27). Die Transaktivatoren E2F1-3 (Abschnitt 1.1.2) sind in quieszenten Zellen vollkommen abwesend bzw. werden nur in ganz geringen Mengen exprimiert (Dyson, 1998). Für den pRb-abhängigen Weg wurde die Assoziation von E2F4 mit den pRb-Familienmitgliedern p130 bzw. p107 an E2F-Promotoren in der G₀-Phase beschrieben (Smith et al., 1996; Takahashi et al., 2000) (Abbildung 27, linke Grafik). E2F4 wirkt als transkriptioneller Repressor (Abschnitt 1.1.2). Der Co-Repressor p130 rekrutiert HDAC und HMT, welche Histone in einen hypoacetylierten und methylierten Zustand versetzen und somit E2F-regulierte Gene stilllegen (Ferreira et al., 2001; Ho & Dowdy, 2002; Nicolas et al., 2003; Rayman et al., 2002; Takahashi et al., 2000). In der Literatur wird auch ein pRb-unabhängiger Weg postuliert, bei dem ohne die Einbindung von pRb-Familienmitgliedern E2F-regulierte Gene in quieszenten Zellen stillgelegt werden (Abbildung 27, rechte Grafik). Hier bindet der transkriptionelle Repressor E2F6, welcher nur eine verkürzte carboxyterminale Domäne besitzt und somit nicht in der Lage ist, Pocket-Proteine zu binden (Morkel et al., 1997). Bis vor kurzen war die Funktion des E2F6 unbekannt (Trimarchi & Lees, 2002), aber eine Veröffentlichung von Ogawa und Mitarbeitern zeigte, dass

E2F6 transkriptionelles *silencing* in der G₀-Phase fördert (La Thangue, 2002; Ogawa et al., 2002). E2F6 rekrutiert *polycomb-group* (PcG)-Proteine und HMTs. PcG-Proteine werden mit der Erhaltung von transkriptionell inaktivem Chromatin in Verbindung gebracht (Trimarchi et al., 2001). HP1 γ bindet an methylierte Lysin 9-Reste des Histon H3 (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Es wird angenommen, dass den HP1 γ -Oligomeren eine entscheidende Rolle beim *silencing* von Euchromatin zukommt (Jones et al., 2001). Eine Besonderheit ist auch die Identifizierung der Interaktion des E2F6 mit Max und Mga (La Thangue, 2002; Ogawa et al., 2002). Myc-Max-Dimere aktivieren die Transkription während Mad-Max-Dimere die Transkription inhibieren (Eisenman, 2001). Mga als weiteres Mitglied der Myc-Familie bindet an Max und verhindert so die Ausbildung der dimeren Myc-Max-Komplexe (Hurlin et al., 1999). Die Assoziation zwischen E2F6 und Max-Mga ermöglicht es, dass gleichzeitig E2F- und Myc-regulierte Promotoren in quieszenten Zellen stillgelegt werden können (La Thangue, 2002), deren Genprodukte für die Zellzyklusprogression essentiell sind (Abschnitt 1.1.2). Auch in seneszenten Zellen sind E2F-regulierte Promotoren stillgelegt (Dimri et al., 1994; Narita et al., 2003). Die fehlende Expression E2F-regulierter Gene sowie der irreversible G₁-Arrest seneszenten Zellen wird mit der Bildung einer speziellen Art fakultativen Heterochromatins, der *senescence associated heterochromatin foci* (SAHF) in Verbindung gebracht (Narita & Lowe, 2004; Narita et al., 2003; Zhang et al., 2005). Diese SAHFs konnten in einigen seneszenten Fibroblasten-Linien gefunden werden, darunter auch in WI-38-Zellen (Narita et al., 2003) (Abbildung 16B). Erst kürzlich wurde veröffentlicht, dass jeder SAHF einem kondensierten Chromosom entspricht (Funayama et al., 2006; Zhang et al., 2007). Eine Reihe von Modifikationen und Proteinen, die mit der Ausbildung von Heterochromatin assoziiert sind, wurden in SAHFs identifiziert. Dazu zählen methylierte Lysin 9-Reste des Histons H3 (Narita et al., 2003), die Histon-Variante macroH2A (Funayama et al., 2006; Zhang et al., 2005), pRb (Narita et al., 2003) und HP1 (Narita et al., 2003; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2005).

In terminal differenzierte Zellen sind E2F-regulierte Promotoren durch Rekrutierung von HMTs transkriptionell reprimiert (Ait-Si-Ali et al., 2004). Mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitationen gelang es nachzuweisen, dass der Anteil an methylierten Lysin 9-Resten des Histon H3 signifikant in differenzierten Myoblasten anstieg.

Die beschriebenen Chromatinmodifikationen an E2F-Loci in quieszenten, seneszenten und differenzierten Zellen können unter anderem die fehlende Cdc45-Expression erklären.

4.3 Abbau des Cdc45-Proteins über den Ubiquitin-Proteasom-Weg

Durch die gleichzeitige Applikation von entweder PMA und MG-132 oder PMA und Lactacystin zur Hemmung des proteasomalen Proteinabbaus während der terminalen Differenzierung von HL60-Zellen konnte das humane Cdc45-Protein stabilisiert werden (Abschnitt 3.2.5). Diese Stabilisierung des Replikationsfaktors Cdc45 durch Proteasominhibitoren deutet auf einen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System hin.

Erste Versuche, eine Polyubiquitinierung des humanen Cdc45-Proteins in frühen Phasen der terminalen Differenzierung von PMA- und MG-132-behandelten HL60-Zellen durch

Immunpräzipitation mit Ubiquitin-spezifischen Antikörpern nachzuweisen, waren leider nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Der *in vivo* Nachweis von ubiquitinierten Proteinen ist zumeist recht schwierig, da ubiquitinierte Proteine sehr instabil sind und andere posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise eine Glykosylierung aber auch Proteinfehlfaltungen die Detektion stark erschweren (Mimnaugh et al., 1999). Weitere Nachweisverfahren des putativ ubiquitinierten Cdc45-Proteins werden im Abschnitt 4.7b vorgestellt.

Die Arbeitsgruppe von C. Vaziri beschäftigt sich ebenfalls mit dem Nachweis der Ubiquitinierung des Cdc45-Proteins. Humanes Cdc45 wurde adenoviral in MG-132-behandelten Zellen exprimiert, und erste massenspektrometrische Analysen zeigten das Vorliegen eines ubiquitinierten Lysin-Restes an Position 528 (persönliche Kommunikation mit C. Vaziri).

Damit liegen nunmehr erstmals Evidenzen für eine posttranslationale Modifikation des Cdc45-Proteins vor.

RING-E3-Ligasen vermitteln die proteasomale Degradation einiger Replikationsfaktoren. Substrate des *anaphase promoting complexes/cyclosomes* (APC/C) sind Cdc6 (Petersen et al., 2000) und Geminin (McGarry & Kirschner, 1998). Hingegen wird Cdt1 vermittelt durch *SKP1-CUL1-F-box-protein* (SCF) abgebaut (Higa et al., 2003; Li et al., 2003a; Sugimoto et al., 2004; Zhong et al., 2003).

Ein charakteristisches Sequenzmotiv von APC/C-Substraten ist die *destruction box* (D-Box) nahe des aminoterminalen Bereiches (Glotzer et al., 1991). Die D-Box besteht aus neun Aminosäureresten, von denen lediglich die Positionen 1 und 4 (RxxL, R = Arginin und L = Leucin) hoch konserviert sind (Hershko & Ciechanover, 1998; Pickart, 2001). D-Boxen wurden in den Aminosäuresequenzen folgender Zellzyklusregulatoren und Replikationsfaktoren identifiziert: Cyclin B1 (Glotzer et al., 1991), Cyclin A (Glotzer et al., 1991), Securin (Zou et al., 1999), Cdc6 (Petersen et al., 2000), Geminin (McGarry & Kirschner, 1998), Dbf4 (Ferreira et al., 2000) und Mcm10 (Izumi et al., 2001).

Ein weiteres Degradationssignal ist die KEN-Box (K = Lysin, E = Glutaminsäure, N = Asparagin) (Pfleger & Kirschner, 2000). KEN-Boxen sind bisher für die Replikationsproteine Cdc6 (Petersen et al., 2000) und Mcm10 (Izumi et al., 2001) beschrieben worden. Substrate, die dieses Motiv besitzen, werden in der späten M- und G₁-Phase vom APC/C^{Cdh1} degradiert (Nakayama & Nakayama, 2006; Pfleger & Kirschner, 2000). Die Cdh1-Komponente fungiert hierbei vermutlich als Co-Aktivator des APC/C und ist für die Substraterkennung notwendig (Pfleger et al., 2001).

Die Existenz derartiger Degradationssignale wurde für Cdc45 bislang nicht untersucht. Deshalb wurde in der primären Aminosäuresequenz des humanen Cdc45 nach möglichen D- und KEN-Boxen gesucht. Für das humane Cdc45-Protein konnten insgesamt sieben putative D-Boxen und eine KEN-Box identifiziert werden (Abbildung 28).

MFVSDFRKEFYEVVQSQRVLLFVASDVALCACKILQALFQCDHVQYTLVPVSCWQLEET	60	<i>Homo sapiens</i> Cdc45
MFVTDFRKEFYETVHNQRVLLFVASDVALCACKILQALFQCDHVQYTLVPVSCWQLEET	60	<i>Mus musculus</i> Cdc45
MFVSDLRKEFDVIVTREVLLLVAPDVALCACKILQALFQCDHVQYTLVPVSCWQLEET	60	<i>Xenopus laevis</i> Cdc45
AFLEHKEQFHYFILINCCANVDLLDILQPDEDTIFVCDTHRPVNVVWVYNDTQIKLLIK	120	<i>Homo sapiens</i> Cdc45
AYLEHKEQFSYFILINCCANVDLLDILQPDEDSIFVCDTHRPVNVVWVYNDTQIKLLIK	120	<i>Mus musculus</i> Cdc45
LFLEHKEQFRYFVLINCCANIDLLETLQPQERAI FYICDTHRPIDVWVWVYND SQVKLLIR	120	<i>Xenopus laevis</i> Cdc45
QDDDLVFPAYEDI FPD EEEDEEHSCNDSDCSEPS EKRTL EEEIVEQTM-RRQRREWEA	179	<i>Homo sapiens</i> Cdc45
QDDDLVFPAYDDI FPD EAEDED LSD SDGDCSEPS EKRTL EEEIVEQNR-KRRQRREWEA	179	<i>Mus musculus</i> Cdc45
QDDDLVFPAYDDI FNDDEEDGDCSNESDCSEPS GKRRFDEAAVEPRIERRQRREWEA	180	<i>Xenopus laevis</i> Cdc45
RRRDLFDYEQYEHGTSSAMVMFELAMMLSKDLNDMLWVAIVGLTDQWVQDKITQMKYV	239	<i>Homo sapiens</i> Cdc45
RRRDLFDYEQYEHGTSSAMVMFELAMMLSKDLNDMLWVAIVGLTDQWVHDKITQMKYV	239	<i>Mus musculus</i> Cdc45
RRRDLFDYEQYEHGTSSAMVMFELAMMLSKDLNDMLWVAIVGLTDQWVQDKITQMKYV	240	<i>Xenopus laevis</i> Cdc45
TDVGVILQPHVSRHNRNED EENTLSVDC TRI SFEYDLRLVLYQHWSLHSLCNTSYTAAR	299	<i>Homo sapiens</i> Cdc45
TDVGVILQPHVSRHNRNED EENTLSVDC TRI SFEYDLRLVLYQHWSLHSLCNTSYTAAR	299	<i>Mus musculus</i> Cdc45
TDVGVILQPHVSRHNRNED EENTLSVDC TRI SFEYDLRLVLYQHWSLHSLCNTSYTAAR	300	<i>Xenopus laevis</i> Cdc45
EKLWSVHCQKRLQEFLLADMCLPLKQVQKQFQAMD ISLKENLREMIIESANKFGMKDMRVQ	359	<i>Homo sapiens</i> Cdc45
EKLWSVHCQKRLQEFLLADMCLPLKQVQKQFQAMD ISLKENLREMIIESANKFGMKDMRVQ	359	<i>Mus musculus</i> Cdc45
EKLWSVHCQKRLQEFLLADMCLPLKQVQKQFQAMD ISLKENLREMIIESANKFGMKDMRVQ	360	<i>Xenopus laevis</i> Cdc45
TFSIHFGFKHKFLASDVVFATMSLMESP EKD GSGTDHFIQALD SLSRSNLDKLYHGLELA	419	<i>Homo sapiens</i> Cdc45
TFSIHFGFKHKFLASDVVFATMSLMESP EKD GSGTDHFIQALD SLSRSNLDKLYHGLELA	419	<i>Mus musculus</i> Cdc45
TFSIHFGFKHKFLASDVVFATMSLMESP EKD GSGTDHFIQALD SLSRSNLDKLYHGLELA	420	<i>Xenopus laevis</i> Cdc45
KKQLRATQQT IASCLC TNLVISQGF FLYCSLMEGTPDVMLFSRPASLSLSKHLKSFVC	479	<i>Homo sapiens</i> Cdc45
KKQLRATQQT IASCLC TNLVISQGF FLYCSLMEGTPDVMLFSRPASLSLSKHLKSFVC	479	<i>Mus musculus</i> Cdc45
KKQLRATQQT IASCLC TNLVISQGF FLYCSLMEGTPDVMLFSRPASLSLSKHLKSFVC	480	<i>Xenopus laevis</i> Cdc45
STKNRCKLLPLVMAAPLSMEHGTVTVVGIP PETDSSDRKNFF GRAFEKAAESTSSRMLH	539	<i>Homo sapiens</i> Cdc45
STKNRCKLLPLVMAAPLSMEHGTVTVVGIP PETDSSDRKNFF GRAFEKAAESTSSRMLH	539	<i>Mus musculus</i> Cdc45
STKNRCKLLPLVMAAPLSMEHGTVTVVGIP PETDSSDRKNFF GRAFEKAAESTSSRMLH	540	<i>Xenopus laevis</i> Cdc45
NHFDLSVIELKAEDRSKFLDALISLLS	566	<i>Homo sapiens</i> Cdc45
NHFDLSVIELKAEDRSKFLDALISLLS	566	<i>Mus musculus</i> Cdc45
NHFDLSVIELKAEDRSKFLDALISLLS	567	<i>Xenopus laevis</i> Cdc45

D-Box Konsensus-Sequenz: RxxLxxxxN (R = Arginin, L = Leucin, N = Asparagin, x = beliebige AS)

KEN-Box Konsensus-Sequenz: KENxxxN (K = Lysin, E = Glutaminsäure, N = Asparagin, x = beliebige AS)

Abbildung 28: Positionen der putativen D-Boxen und der KEN-Box in der Cdc45-Aminosäuresequenz

Die Aminosäuresequenzen der Cdc45-Homologen aus *Homo sapiens* (O75419), *Mus musculus* (Q9Z1X9) und *Xenopus laevis* (Q9YH26) wurden aus UniProtKB/Swiss-Prot entnommen (<http://www.expasy.org/uniprot>). Für das Sequenz-Alignment wurde das Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) verwendet. Die Konsensus-Sequenzen der D- und KEN-Boxen sind aus (Glötzer et al., 1991) bzw. (Pfeifer & Kirschner, 2000) entnommen. Die Positionen der putativen D-Boxen (rot/schwarz) und der KEN-Box (grün) sind entsprechend hervorgehoben.

Eine dieser D-Boxen war im aminoterminalen Bereich des humanen Cdc45-Proteins lokalisiert (Aminosäuren 18-26). Darüber hinaus zeigte ein *Alignment* der Aminosäuresequenzen des Cdc45 aus Mensch, Maus und dem Krallenfrosch, dass die Degradationsmotive innerhalb der Vertebraten relativ konserviert vorliegen. Es wurden acht D-Boxen gefunden (Abbildung 28). Drei dieser D-Box-Sequenzen sind hochkonserviert und zeichnen sich durch ein R (Arginin) in der 1. Position und ein L (Leucin) in der 4. Position aus. Die KEN-Box-Sequenz ist für humanes Cdc45 und *Xenopus*-Cdc45 konserviert, hingegen liegt ein Austausch der Aminosäure E (Glutaminsäure) gegen G (Glycin) an der Position 2 des murinen Cdc45 vor.

Cdc45 kann demzufolge die Liste der APC/C^{Cdh1}-Substrate erweitern, die sowohl D- als auch KEN-Boxen besitzen. Zwei Forschergruppen fanden heraus, dass der Co-Aktivator Cdh1 auch in differenzierten Zellen mit APC/C assoziiert war (Almeida et al., 2005; Gieffers et al., 1999).

Demnach wäre eine Degradation des Cdc45-Proteins vermittelt durch APC/C^{Cdh1} in sich differenzierenden HL60-Zellen durchaus möglich.

Die Stabilisierung des Cdc45-Proteins durch proteasomale Inhibitoren (Abschnitt 3.2.5) und die identifizierten Degradationsmotive (Abbildung 28) verweisen auf einen Ubiquitin-Proteasom-vermittelten Abbau des humanen Cdc45-Proteins. Die Funktionalität der identifizierten Boxen sowie die Einbindung des APC/C^{Cdh1} in die Cdc45-Degradation sollten in weiterführenden Experimenten überprüft werden (Abschnitt 4.7b).

Zusammenfassend kann basierend auf Literaturangaben und den hier vorgestellten Studien mit quieszenten, seneszenten und terminal differenzierten Kulturzellen konstatiert werden, dass die fehlende Expression des humanen Cdc45-Proteins in nicht-proliferierenden Zellen mit transkriptionellem *silencing* sowie Proteinabbau begründbar wäre.

4.4 Keine Spaltung des humanen Cdc45-Proteins im Zuge der Apoptose

In der Literatur finden sich Hinweise auf eine Repression der DNA-Replikation in apoptotischen Zellen (Yim et al., 2006). Zum einen werden definiert Replikationsfaktoren proteolytisch durch Caspasen degradiert und damit inaktiviert (siehe unten). Zum anderen wird die Synthese von DNA unterbunden, weil es beim programmierten Zelltod zur Kondensation des Chromatins (Robertson et al., 2000) und zur charakteristischen DNA-Fragmentierung (Zhang & Xu, 2000) kommt.

Zu den Proteinen des prä-replikativen Komplexes, die unabhängig vom apoptotischen Stimulus in humanen Zellen durch Caspase 3 gespalten werden, zählen Cdc6 (Pelizon et al., 2002; Schories et al., 2004; Yim et al., 2006; Yim et al., 2003) und Mcm3 (Schories et al., 2004; Schwab et al., 1998). Yim und Mitarbeiter berichteten, dass das Vorhandensein des apoptotischen p32-Cdc6-Spaltprodukts die Ladung von Mcm2 in das Chromatin verhinderte, zugleich die Kinasen ATM/ATR aktivierte und eine Erhöhung der Proteinmengen von p53 und Bax hervorrief (Yim et al., 2006). Daraus schlussfolgerten sie, dass p32-Cdc6 als dominant negativer Inhibitor der Replikationsinitiation in apoptotischen Zellen fungiert und den p53-Bax-vermittelten Apoptoseweg aktiviert. Bemerkenswert ist auch, dass trotz der Existenz potentieller Caspase 3-Spaltstellen in allen Untereinheiten des Mcm2-7-Komplexes, nur Mcm3 und in limitiertem Maße Mcm2 gespalten werden (Hu et al., 1993; Schwab et al., 1998) (Abschnitt 3.2.6). Unlängst wurde gefunden, dass auch das humane Geminin-Protein in apoptotischen Zellen Caspase 3-vermittelt gespalten wird (Roukos et al., 2007). Ferner wurde beschrieben, dass am Elongationsprozess beteiligte Faktoren durch Caspase 3 degradiert werden: die 140 kDa-Untereinheit des RF-C (Rheaume et al., 1997; Ubeda & Habener, 1997) und die 261 kDa-Untereinheit der DNA-Polymerase ϵ (Liu & Linn, 2000).

Es existierten bisher keine Daten zum Verhalten des Cdc45-Proteins in apoptotischen Zellen. Die hier präsentierten Resultate belegen nun, dass Cdc45 in humanen Zelllinien, bei denen durch verschiedene Stimuli Apoptose induziert wurde, keine Spaltung erfährt (Abschnitt 3.2.6). Vielmehr war das Cdc45-Protein ähnlich wie Orc2, Mcm5 oder Mcm7 (Pelizon et al., 2002; Schwab et al., 1998) in unveränderter Menge in apoptotischen Zellen präsent.

Im Verlauf des programmierten Zelltods wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt, wodurch die Neusynthese von Adenosin-Triphosphat (ATP) durch die mitochondriale Elektronentransportkette negativ beeinflusst wird (Waterhouse et al., 2002). Somit ist das für die Caspase-Aktivität notwendige ATP nur noch in limitierter Menge in apoptotischen Zellen vorhanden. Darüber hinaus ist bekannt, dass Zellen bei ATP-Mangel vom apoptotischen zum nekrotischen Zelltod wechseln (Grusch et al., 2002; Ha & Snyder, 1999; Nicotera & Leist, 1997; Tsujimoto, 1997). Die Erhaltung eines gewissen zellulären ATP-Spiegels durch Herabregulation von unnötigen ATP-verbrauchenden Prozessen verhindert dieses Ereignis und damit auch negative Folgeerscheinungen für den Körper, die mit einer nekrotischen Entzündungsreaktion einhergehen würden. Durch die katalytische Aktivität der Mcm2-7-Helikasen und der DNA-Polymerasen würde in Zellen, die dem programmierten Zelltod zugeführt werden sollen, die aber aktiv DNA replizieren, ATP verbraucht. Die Repression der DNA-Replikation durch gezielte Spaltung ausgewählter Replikationsproteine reduziert den ATP-Verbrauch und ermöglicht somit den ungestörten Ablauf der Apoptose (Schories et al., 2004).

Verschiedene Studien implizieren, dass in humanen Zelllinien im Zuge der Apoptose keine indiskriminative Spaltung von Replikationsproteinen stattfindet, sondern gezielt einzelne Faktoren degradiert werden. Zum einen wird die Replikationsinitiation unterbunden, da die korrekte Assemblierung des prä-replikativen Komplexes beeinflusst wird. Zum anderen werden die replikativen Polymerasen sowie deren akzessorische Faktoren degradiert und damit prozessive DNA-Synthese inhibiert. Demnach wird in apoptotischen Zellen auf mehreren Ebenen ungewollte, energieverbrauchende DNA-Synthese unterbunden.

4.5 Halbwertszeit und Molekülzahl des humanen Cdc45-Proteins

Durch radioaktive metabolische Markierung gelang es, die Halbwertszeit ($T_{1/2}$) des endogenen humanen Cdc45-Proteins mit 10h-12h zu bestimmen (Abschnitt 3.3). Bemerkenswert war auch, dass die Quantifizierung der Cdc45-Signale von PMA-behandelten HL60-Zellen eine deutliche Reduktion der Proteinmenge nach 24h PMA-Inkubation auf 40-50% bzw. nach 36h PMA-Inkubation auf 20-25% des Wertes der 12h-Probe zeigte (Abbildung 17B). Diese Abnahme der Signalintensität korrelierte mit der durch [35 S]-Markierung bestimmten Halbwertszeit des humanen Cdc45-Proteins in HeLa S3-Zellen (Abbildung 22C).

Demzufolge zählt Cdc45 nicht wie Cdc6 [$T_{1/2}$: 2-3h (Blanchard et al., 2002; Petersen et al., 2000)] zu den kurzlebigen Proteinen, sondern kann vielmehr neben Mcm3 [$T_{1/2}$: 20h (Musahl et al., 1998)] und PCNA [$T_{1/2}$: 24h (Bravo & Macdonald-Bravo, 1987)] als stabiles Protein angesehen werden. Dass es sich bei Cdc45 um ein langlebiges Protein *in vivo* handelt, kann auch in Einklang mit der so genannten N-End-Regel gebracht werden (Bachmair et al., 1986; Dice, 1987; Gonda et al., 1989; Levy et al., 1996; Varshavsky, 1992; Varshavsky, 1996; Varshavsky, 1997). Hiernach determiniert der aminoterminal Rest die Halbwertszeit eines Proteins. Nimmt Methionin, wie im Falle der Vertebraten Cdc45-Homologe (Abbildung 28) die 1. Position in der Aminosäuresequenz ein, handelt es sich definitionsgemäß um ein stabiles Protein.

Angaben zur zellulären Abundanz und zur Lokalisation eines Proteins können Hinweise auf die endogene Funktion geben (Kawasaki et al., 2000). Die Erkenntnis, dass Cdc45-Moleküle in signifikant geringerer Menge im Vergleich zu Mcms im *Xenopus*-Replikationssystem vorlagen, regte die Formulierung der Hypothese an, dass Cdc45 möglicherweise der limitierende Faktor für die Initiation der DNA-Replikation sein könnte (Dolan et al., 2004; Forsburg, 2004).

Ein Überschuss von Mcm2-7-Proteinen im Vergleich zu vorhandenen Replikationsstartstellen oder Initiationsereignissen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen für *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenopus laevis* und humane Zellen beschrieben.

In der Bäckerhefe wird die DNA-Replikation in etwa alle 40 kb initiiert (Gilbert, 2001) bzw. pro haploide Zelle wurden 350-470 *origins* identifiziert (Campbell & Newlon, 1991; Raghuraman et al., 2001; Wyrick et al., 2001). Die Anzahl der ORC-Komplexe entspricht mit 600 nahezu der *origin*-Anzahl (Rowley et al., 1995). Hingegen wurden deutlich mehr Mcm2-7- und auch Mcm10-Moleküle gefunden: 40.000 Mcm2 (Lei et al., 1996), 18.000 Mcm3 (Donovan et al., 1997), 12.000 Mcm5 (Donovan et al., 1997), 30.000 Mcm7 (Donovan et al., 1997) und 37.000 Mcm10 (Kawasaki et al., 2000).

Für Krallenfrosch-Embryonen wurde ermittelt, dass die Replikationsinitiation alle 10 kb ohne Sequenzspezifität stattfindet (Blow, 2001; Hyrien & Mechali, 1993; Walter & Newport, 1997). Pro *origin* konnten 1 ORC-Komplex (Edwards et al., 2002; Walter & Newport, 1997; Wohlschlegel et al., 2002), 2 Cdc6- (Oehlmann et al., 2004), 1-2 Cdc45- (Edwards et al., 2002; Woodward et al., 2006), 10-40 Mcm3- (Edwards et al., 2002; Mahbubani et al., 1997) und 2 Mcm10-Moleküle (Wohlschlegel et al., 2002) gefunden werden. Auch hier existierte eine Übereinstimmung hinsichtlich der Anzahl der Replikationsstartpunkte und der vorhandenen ORC-Komplexe. Darüber hinaus kann das Verhältnis *origin* zu Cdc45 mit 1:1-2 angegeben werden. Bemerkenswert ist allerdings, dass die Anzahl an Mcm2-7-Komplexen die der *origins* um den Faktor 10-40 übersteigt.

In somatischen Zellen finden etwa 25.000 Initiationsereignisse statt (Hand, 1978). Die Molekülzahlen einzelner Replikationsproteine wurden je HeLa-Zelle wie folgt kalkuliert: 100.000 Mcm2 (Todorov et al., 1995), 1.000.000 Mcm3 (Burkhart et al., 1995), 30.000 Cdt1 und 30.000 Geminin (Xouri et al., 2004). Ein Teilprojekt dieser Dissertation diente der Bestimmung der Molekülmenge des Cdc45 in humanen Kulturzellen. Je HeLa S3- und T98G-Zelle liegen ungefähr 45.000 Cdc45-Moleküle vor (Abschnitt 3.4). Damit wären in humanen somatischen Zellen ähnlich wie im *Xenopus*-System theoretisch 1-2 Cdc45-Proteine je Initiation verfügbar. Da aber nicht alle *origins* zur gleichen Zeit aktiviert werden und Cdc45 zeitabhängig mit frühen und späten *origins* assoziiert (Aparicio et al., 1999; Zou & Stillman, 2000), sind auch Cdc45-Moleküle im Überschuss vorhanden. Beachtlich ist jedoch, dass die Anzahl an Mcm-Molekülen in HeLa-Zellen um ein Vielfaches die Anzahl der Cdc45-Moleküle übersteigt. Interessanterweise liegen aber in humanen Zellen annähernd gleiche Molekülmengen von Cdt1, Geminin und Cdc45 vor.

Die große Anzahl von chromatingebundenen Mcm2-7-Komplexen wird in der Literatur als „Mcm-Paradox“ geführt (Hyrien et al., 2003). Es wurde beschrieben, dass Mcms nicht immer mit aktiven DNA-Replikationsstellen in der S-Phase co-lokalisieren (Dimitrova et al., 1999;

Krude et al., 1996; Madine et al., 1995) und distinkt von ORC-Komplexen an DNA gebunden sind (Danis et al., 2004; Edwards et al., 2002; Ritzi et al., 1998). Es werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, welche Funktionen die überschüssigen Mcm2-7-Komplexe haben könnten. Nach dem *rotary pump*-Modell sind multiple Mcm2-7-Komplexe immobilisiert und arbeiten kooperativ zusammen, um die doppelsträngige DNA zu entwinden (Laskey & Madine, 2003). Ein anderer Denkansatz verweist auf die Möglichkeit, dass Mcm2-7-Komplexe in die *checkpoint*-Aktivierung involviert sein könnten (Cortez et al., 2004; Shechter & Gautier, 2004; Tsao et al., 2004). Im vergangenen Jahr wurde die Hypothese formuliert, dass Mcm2-7-Moleküle dormante Replikationsstartpunkte markieren könnten (Woodward et al., 2006). Tritt replikativer Stress auf, werden dann diese zusätzlich markierten *origins* aktiviert. Für das *Xenopus*-System wurden 10 dormante *origins* je aktivem *origin* postuliert und ATM/ATR wird eine entscheidende Rolle bei der Inhibierung des „Feuerns“ dieser dormanten Replikationsstartpunkte zugesprochen (Marheineke & Hyrien, 2004; Shechter et al., 2004; Woodward et al., 2006).

Edwards und Mitarbeiter zeigten die strikte Korrelation zwischen der Effizienz der DNA-Replikation und des Anteils an chromatingebundenem Cdc45 (Edwards et al., 2002). Hieraus wurde geschlussfolgert, dass die Bindung von Cdc45-Molekülen und nicht die des Mcm2-7-Komplexes an Chromatin limitierend für die DNA-Replikation ist. Auch rekrutiert nur ein kleiner Teil der chromatingebundenen Mcm2-7-Komplexe Cdc45. In Abschnitt 1.3.9 wurde bereits erläutert, dass nach Aktivierung des intra-S-Phase-Kontrollpunktes durch DNA-Schäden Cdc45 nicht an *origins* rekrutiert wird und somit eine Initiation von späten Replikationsstartpunkten unterbleibt. Auch hierdurch wird die Ausnahmestellung des Cdc45-Proteins bei der Initiation der eukaryotischen DNA-Replikation untermauert. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die signifikant geringere Menge an Cdc45-Molekülen im Vergleich zu Mcms nun auch für humane Zellen bestätigt wurde. Die Idee, dass Cdc45 der entscheidende Faktor für die Replikationsinitiation sei (Dolan et al., 2004; Forsburg, 2004), kann folglich auf Säuger übertragen werden.

4.6 Cdc45 als neuer Proliferationsmarker in der Tumorphathologie

Eine Überexpression der Replikationsproteine Cdc6 (Karakaidos et al., 2004; Murphy et al., 2005), Cdt1 (Karakaidos et al., 2004; Xouri et al., 2004) und Mcm7 (Brake et al., 2003; Cromer et al., 2004; Grutzmann et al., 2004; Ishimi et al., 2003; Padmanabhan et al., 2004; Ren et al., 2006) wurde bereits für humane Krebszellen beschrieben. Ergebnisse der vorliegenden Dissertation belegen nun erstmals die erhöhte Expression des humanen Cdc45-Proteins in diversen Tumorzelllinien (Abschnitt 3.5). Interessant wäre die Untersuchung der Mechanismen, die zur erhöhten Cdc45-Expression in Tumorzellen geführt haben. Xouri et al. beschrieben beispielsweise die Akkumulation der Cdt1-mRNA und des -Proteins in Krebszellen. Die erhöhte mRNA-Menge könnte darauf verweisen, dass die Überexpression durch verstärkte Transkription oder Genamplifikation zustande gekommen ist (Xouri et al., 2004). Inwieweit Genamplifikationen oder andere Mechanismen die erhöhte Menge des Cdc45-Proteins in Tumorzellen bedingen, sollte experimentell abgeklärt werden.

In Hefen und humanen Zellen führte die Überexpression von Cdc6 und Cdt1 zu Re-Replikation und genomischer Instabilität (Nishitani et al., 2000; Vaziri et al., 2003). Experimente, die sich mit den Effekten einer Cdc45-Überexpression beschäftigen, wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben (Abschnitt 4.7c).

Bemerkenswerterweise wurde im vergangenen Jahr für einige Komponenten des prä-replikativen Komplexes eine fehlgesteuerte Expression bzw. Überexpression mit maligner Transformation in Verbindung gebracht. So führte die Überexpression von Mcm7 zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber induzierter Tumorigenese (Honeycutt et al., 2006) bzw. zur beschleunigten Ausbildung von Tumoren (Yoshida & Inoue, 2003). Als putatives Onkogen wird auch Cdc6 diskutiert, da eine erhöhte Menge des Replikationsfaktors direkt mit der Repression des *INK4A*-Locus korreliert werden konnte (Gonzalez et al., 2006; Gonzalez & Serrano, 2006). Ob und in welchem Umfang eine Überexpression des Cdc45-Proteins die Tumorigenese beeinflusst, ist bisher ebenfalls noch unbekannt (Abschnitt 4.7c).

Western-Blot-Analysen zeigten ferner, dass exklusiv in Extrakten der promyelozytischen Leukämie-Zelllinie HL60 zwei nah beieinander liegende Cdc45-Signale detektierbar waren (Abbildungen 17B und 25B, Bahn 6). Auch wurde das Cdc45-Protein in *Drosophila melanogaster* in mehreren Banden unterschiedlichen Molekulargewichtes bestimmt (Loebel et al., 2000). Das auffällige Cdc45-Doppelbandenmuster in HL60-Zellen könnte durch posttranslationale Proteinmodifikationen, durch enzymatische Proteinspaltungen oder im Vorliegen von Proteinisoformen begründet sein.

Nachgewiesen wurde bereits, dass die in humanen Zellen gefundene Mcm2-Dublette durch Phosphorylierungen zustande gekommen ist (Todorov et al., 1995). Um zu testen, ob das Cdc45-Protein in HL60-Zellen phosphoryliert vorlag, wurden einerseits *in vitro* Dephosphorylierungsexperimente mit Lambda-Phosphatase und andererseits Immunpräzipitationen mit phosphospezifischen Antikörpern durchgeführt. Weder die Dephosphorylierung führte zu einer Veränderung des Doppelbanden-Musters, noch konnte phosphoryliertes Cdc45 immunpräzipitiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Resultate implizieren, dass die prägnante Cdc45-Dublette in HL60-Zellen wahrscheinlich nicht durch Phosphorylierungen zustande gekommen ist. Der Nachweis bzw. Ausschluss von anderen posttranslationalen Modifikationen könnte helfen, die Natur der Cdc45-Doppelbande aufzuklären (Abschnitt 4.7a). Eine Veränderung des Cdc45-Doppelbandenmusters konnte auch nicht nach Gabe von Inhibitoren des Proteinabbaus festgestellt werden (Abbildung 19). Auch blieb dieses typische Cdc45-Signal in apoptotischen HL60-Zellen bestehen (Daten nicht gezeigt). Die letztgenannten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Cdc45-Doppelbande in HL60-Zellen nicht durch Proteindegradation hervorgerufen wurde.

Der Vergleich von cDNA-Bibliotheken aus HeLa-Zellen und TIG1-Fibroblasten zeigte bereits die Existenz von Cdc45-Spleißvarianten auf (Kukimoto et al., 1999). Auch konnten in Northern-Blot-Analysen Cdc45-Transkripte in variabler Länge in humanen Geweben nachgewiesen werden (Shaikh et al., 1999). Bis jetzt existieren in der Literatur keine Angaben zur Detektion von Cdc45-Proteinisoformen in Zellen oder Geweben. Ob es sich bei der in HL60-Zellen gefundenen Cdc45-Dublette um Proteinisoformen handelt, sollte durch entsprechende Experimente geklärt werden (Abschnitt 4.7a).

Ein Markenzeichen von Tumorzellen ist eine deregulierte Zellproliferation (Evan & Vousden, 2001) (Abbildung 9). Der größte Teil der Tumorerkrankungen kann erfolgreicher behandelt werden, wenn präkanzerogene Läsionen oder maligne Zellen in frühen Stadien detektiert werden (Coleman et al., 2006). Die Einführung von Proliferationsmarkern hat es ermöglicht, dass eine frühzeitige Diagnose stattfinden kann. Ergänzend hilft die Bewertung der proliferativen Aktivität eines Tumors, Prognosen für die Überlebensrate der Patienten abzugeben und geeignete Therapien zu empfehlen. Als etablierte Marker werden in der Immunhistochemie vor allem Ki-67/MIB-1 und PCNA nachgewiesen (Bruno et al., 1992; Hall & Levison, 1990; van Diest et al., 1998).

Ki-67 ist ein proliferationsassoziiertes Antigen, wird vor allem in der S-, G₂- und M-Phase exprimiert (Gerdes et al., 1983; Scholzen & Gerdes, 2000) und ist in quieszenten Zellen nicht detektierbar (Gerdes et al., 1984; Gerdes et al., 1983). Jedoch kann die Ki-67-Expression auch in proliferierenden Zellen durch Mitogenmangel reduziert werden (Verheijen et al., 1989). Auch ist das Antigen sehr sensitiv gegenüber chemischer Denaturierung und kann durch sehr verdünnte Formalin-Lösungen zerstört werden (Brown & Gatter, 1990; van Dierendonck et al., 1991). Bis heute gelang es nicht, die Funktion des Ki-67-Proteins aufzuklären. Es existieren aber Evidenzen, dass Ki-67 in die ribosomale Biogenese eingebunden ist und demnach nicht unmittelbar mit zellulärer Proliferation korreliert (Bullwinkel et al., 2006; MacCallum & Hall, 2000).

PCNA ist ein Co-Faktor der DNA-Polymerase δ und wird häufig immunhistochemisch detektiert (Prelich et al., 1987). Zusätzlich zu seiner molekularen Rolle in der DNA-Replikation ist PCNA auch in DNA-Reparatur eingebunden (Celis & Madsen, 1986; Maga & Hubscher, 2003; Toschi & Bravo, 1988; Touille & Hubscher, 2004). Deshalb ist der Nachweis dieses Antigens nicht ausschließlich mit einer proliferierenden Zellpopulation in Verbindung zu bringen (Hall & Levison, 1990).

Eine entscheidende Limitation der Marker Ki-67/MIB-1 und PCNA ist, dass sie zwar effektiv Zellen detektieren, die sich in der S-, G₂- und M-Phase des Zyklus befinden aber weniger sensitiv G₁-Zellen nachweisen (Shreeram & Blow, 2003). Es wurde berichtet, dass die G₁-Phase in vielen proliferierenden Tumorzellen verlängert ist (Lei, 2005). Der Einsatz von Markern, die vor allem spätere Zellzyklusphasen detektieren, könnte zur Unterbestimmung des G₁-Anteils einer Zellpopulation führen. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass Ki-67 vereinzelt in S-Phase-Zellen nicht nachweisbar war und damit proliferierende Zellen nicht angezeigt werden konnten (Coleman et al., 2006). Zusammenfassend ist festzustellen, dass die in der Tumorpathologie routinemäßig eingesetzten Proliferationsmarker Ki-67/MIB-1 bzw. PCNA auch einige Limitationen birgen, was die Suche nach Alternativen angeregt hat.

Als alternative Marker für die Wachstumsfraktion eines Tumors wurden in den vergangenen Jahren Mcms, Cdc6 und Geminin untersucht (Coleman et al., 2006; Gonzalez et al., 2005; Laskey, 2000; Laskey, 2005; Semple & Duncker, 2004; Shreeram & Blow, 2003; Tachibana et al., 2005; Teer & Dutta, 2005). Da die Mcm-Proteine bislang im Fokus des Interesses standen und stehen, wird im Folgenden ausschließlich auf diese potentiellen Biomarker eingegangen.

Als effektive diagnostische Marker für proliferierende dysplastische und maligne Tumorzellen haben sich unter anderem Mcm2 (Bukholm et al., 2003; Chatrath et al., 2003; Dudderidge et al., 2005; Gonzalez et al., 2003; Hunt et al., 2002; Ramnath et al., 2001; Scott et al., 2003; Tan et al., 2001; Wharton et al., 2001) und Mcm7 (Hiraiwa et al., 1997; Li et al., 2005; Padmanabhan et al., 2004) erwiesen. In den meisten Fällen wurden mehr Mcm-positive Zellen im Vergleich zu Ki-67 oder PCNA detektiert. Immunhistochemische Studien sowie Expressionsanalysen basierend auf *microarrays* haben Mcms auch als prognostische Marker für epitheliale Tumorarten identifiziert. Ein erhöhter Anteil an Mcm-positiven Zellen im malignen Gewebe war mit einer schlechten Prognose für Patienten mit Brustkrebs (Bukholm et al., 2003; Gonzalez et al., 2003), Lungenkrebs (Hashimoto et al., 2004; Ramnath et al., 2001; Tan et al., 2001), Gehirntumoren (Hunt et al., 2002; Scott et al., 2003; Wharton et al., 2001), Prostatakrebs (Meng et al., 2001), Ösophaguskrebs (Kato et al., 2003) sowie Nieren- und Blasenkrebs (Kruger et al., 2003; Rodins et al., 2002) assoziiert. Bei Brustkrebs gelten mehr als 20% Ki-67-positive Zellen als prognostisch ungünstig (Lelle et al., 1987). Erstaunlicherweise erwies sich der Mcm2-Index im Vergleich zu Ki-67 bei der Voraussage der Überlebenszeit für Brustkrebspatientinnen als prognostisch überlegen (Gonzalez et al., 2003). Zusätzlich wurde gezeigt, dass erhöhte Mengen an Mcm-Transkripten in vielen Tumorentitäten vorlagen, was ebenfalls mit einer schlechten klinischen Prognose korrelierte (Neben et al., 2004; Rhodes et al., 2004; Sotiriou et al., 2003; van 't Veer et al., 2002).

Cdc45 ist entsprechend den hier präsentierten Daten unabhängig von Ki-67 und PCNA mit zellulärer Proliferation assoziiert (Abschnitte 3.1 bis 3.2.4) und sollte demzufolge als möglicher neuer Marker in der Tumorphathologie getestet werden. Damit wäre eine enge Verknüpfung zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung gegeben. Zusätzlich wurde gefunden, dass Cdc45 nicht in Doppelstrang-Bruch-Reparatur (Wang et al., 2004) oder NER (Abschnitt 3.2.1) eingebunden ist. Damit hätte die Detektion von Cdc45 gegenüber PCNA den Vorteil, dass keine nicht-proliferierenden Zellen angefärbt werden, die diese Arten der Reparatur ausführen.

Initiale Versuche, die die Verwendbarkeit eines monoklonalen Cdc45-spezifischen Antikörpers für immunhistochemische Applikationen an humanen Gewebeschnitten aufklären sollten, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. J. Säger von der Pathologie in Bad Berka durchgeführt. Der Cdc45-spezifische Antikörper war an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Schnitten gut immunreaktiv (Abschnitt 3.6). Das Cdc45-Signal war zumeist nukleär detektierbar, bei normalem Hautgewebe primär auf die Proliferationszone der Basalregion beschränkt und bei malignem Gewebe mit der Tumorzellpopulation assoziiert (Abbildung 26). Natürlich sind weiterführende immunhistochemische Analysen notwendig, um die potentielle Einsetzbarkeit des Replikationsfaktors Cdc45 als Proliferationsmarker in der pathologischen Diagnostik zu eruieren (Abschnitt 4.7d). Unter Umständen könnte der parallele Nachweis der konventionellen Marker Ki-67 und PCNA sowie der Replikationsproteine Mcm2-7, Geminin und Cdc45 an bestimmten Tumorentitäten akkuratere diagnostische und vielleicht auch prognostische Aussagen ermöglichen. Zu beachten ist ferner die Präsenz der Mcms und des Cdc45 in G₁-Phase-Zellen, was bei der Diagnose von proliferierenden Krebszellen, die sich durch eine verlängerte G₁-Phase auszeichnen (Lei, 2005), hilfreich sein kann.

4.7 Ausblick

Die in der vorliegenden Dissertation präsentierten Ergebnisse haben viele interessante Erkenntnisse zur Zellzyklusregulation und zur Kontrolle der Cdc45-Expression aufgezeigt. Jedoch konnten nicht alle Projekte abschließend bewertet werden. Im folgenden Ausblick sollen daher einige Aspekte herausgegriffen und weiterführende experimentelle Ansätze für zukünftige Studien aufgezeigt werden.

a. Charakterisierung der Cdc45-Doppelbande in HL60-Zellen

Das Cdc45-Protein wurde ausschließlich in der promyelozytischen Leukämie-Zelllinie HL60 als prominente Doppelbande detektiert, welche vermutlich nicht durch Phosphorylierungen entstanden ist (Abschnitte 3.5 und 4.6). Es wäre wichtig, dass Vorliegen von anderen potentiellen posttranslationalen Modifikationen wie Acetylierung, Glykosylierung, Poly-ADP-Ribosylierung etc. abzuklären. Parallel könnte mittels Northern-Blot oder RT-PCR nach Transkripten mit variabler Länge geschaut werden. Liegen weder posttranslationale Modifikationen noch Spleißvarianten vor, könnte die Cdc45-Doppelbande auch durch die Nutzung alternativer Translationsstartstellen entstanden sein. Diese Möglichkeit sollte dann experimentell untersucht werden.

b. Nachweis der Ubiquitin-Proteasom-vermittelten Cdc45-Degradation

Für Cdc45 wurden bisher in der Literatur keinerlei posttranslationale Proteinmodifikationen beschrieben. Unpublizierte Daten von C. Vaziri und die im Rahmen dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse (Abschnitte 3.2.5 und 4.3) deuten auf eine Ubiquitinierung des humanen Cdc45-Proteins und dessen proteasomalen Abbau hin.

Der Nachweis des ubiquitinierten Cdc45 könnte beispielsweise durch transiente Transfektion von Zellen mit His- oder GST-markiertem Ubiquitin und selektiver Präzipitation mit His-/GST-spezifischen Antikörpern gelingen (Mimnaugh et al., 1999). Ein denkbarer Ansatz wäre auch die radioaktive Markierung von *in vitro* transkribiertem und translatiertem Protein, gefolgt von der Inkubation mit Ubiquitin-Ligase und Ubiquitin. Eine anschließende Elektrophorese mit autoradiographischer Detektion könnte ubiquitiniertes Protein sichtbar machen (Mimnaugh et al., 1999).

Weiterhin sollte die Interaktion mit Ubiquitin-Ligasen überprüft werden, wobei hier APC/C^{Cdh1} besondere Beachtung finden sollte. Die identifizierten Degradationsmotive in der Cdc45-Aminosäuresequenz (Abbildung 28) sprechen dafür, dass der APC/C^{Cdh1} in den Ubiquitin-Proteasom-vermittelten Abbau des humanen Cdc45-Proteins eingebunden sein kann. Die Konstruktion von Mutanten könnte die Funktionalität und Essentialität der D- und KEN-Boxen beleuchten. Auch könnten Interaktionsstudien eine direkte Wechselwirkung zwischen Cdc45 als Substrat und E3-Ligasen klären.

c. Auswirkungen der Cdc45-Überexpression

Eine erhöhte Menge an humanem Cdc45-Protein konnte in Tumorzellen nachgewiesen werden, die aus verschiedenen Ursprungsgeweben etabliert wurden (Abschnitte 3.5 und 4.6). Bislang ist nicht erforscht, welchen Einfluss eine Cdc45-Überexpression auf zellulärer Ebene hat. Hingegen ist bekannt, dass die Überexpression von Cdc6 und Cdt1 Re-Replikation und

genomische Instabilität zur Folge hat ([Nishitani et al., 2000](#); [Vaziri et al., 2003](#)). Auch wurden Mcm7 und Cdc6 als mögliche Onkogene ausgewiesen, die entscheidenden Anteil am Tumorigeneseprozess haben ([Gonzalez et al., 2006](#); [Gonzalez & Serrano, 2006](#); [Honeycutt et al., 2006](#); [Yoshida & Inoue, 2003](#)). Ob und inwieweit eine fehlregulierte Cdc45-Expression ebenfalls Einfluss auf die Tumorigenese hat, könnte in zukünftigen Projekten untersucht werden.

d. Ausweitung der immunhistochemischen Cdc45-Detektion

Erste Versuche zeigten an Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten humanen Gewebeschnitten die gute Reaktivität des Cdc45-spezifischen Antikörpers C45-3G10 ([Abschnitte 3.6 und 4.6](#)). Kooperationen mit J. Sängler von der Pathologie in Bad Berka, H.-W. Stürzbecher vom Institut für Pathologie Lübeck und G. Callagy von der Nationalen Universität Galway, Irland werden weiterführende immunhistochemische Untersuchungen ermöglichen.

Interessant wäre die Cdc45-Detektion an anderen Normalgeweben mit definierter Proliferationszone. Hierzu bieten sich, ähnlich wie für Mcm2 ([Kingsbury et al., 2005](#); [Scott et al., 2003](#); [Todorov et al., 1998](#)) bereits gezeigt, Gewebeproben von Kolon-Krypten an. Der Antikörper sollte zudem auch an anderen Tumorentitäten wie beispielsweise Prostatakarzinomschnitten getestet werden, um die erhaltenen Signale mit denen der etablierten Proliferationsmarker Ki-67, PCNA sowie Mcm2 ([Meng et al., 2001](#)) zu vergleichen. Wichtig wäre auch die Prüfung der Applizierbarkeit des Cdc45-spezifischen Antikörpers an Gefrierschnitten und Zellbiopsien.

5 Zusammenfassung

Die hier präsentierten Ergebnisse tragen entscheidend zum verbesserten Verständnis der Regulation des humanen Replikationsfaktors Cdc45 bei.

Es wurde erstmals eine positive Korrelation zwischen Cdc45-Expression und aktiver Zellproliferation gezeigt, da humanes Cdc45 ohne Schwankungen in der Proteinmenge in allen Phasen zyklisierender Zellen nachweisbar war. Das Cdc45-Protein war in der Interphase ausschließlich nukleär lokalisiert. Nach Auflösung der Kernmembran in der Mitose fand sich das Protein dann gleichmäßig in der gesamten Zelle verteilt. Prominent war ferner die Existenz von Cdc45-Spots in replizierenden Zellen, die mit BrdU-Foci partiell co-lokalisierten. In allen anderen Zellzyklusphasen konnte nur ein disperses Cdc45-Signal detektiert werden. Cdc45 wurde hingegen nicht in quieszenten, seneszenten und differenzierten Zellen detektiert.

In apoptotischen Zellen konnte keine Spaltung des Cdc45-Proteins nachgewiesen werden. Vielmehr werden hier gezielt einzelne Komponenten des prä-replikativen Komplexes und Replikationsfaktoren, die an der Elongationsphase beteiligt sind, von Caspasen abgebaut. Dadurch wird die energieverbrauchende DNA-Replikation in Zellen, die das apoptotische Programm initiiert haben, unterbunden.

Humanes Cdc45 erwies sich als stabiles Protein mit einer Halbwertszeit von etwa 10h-12h in zyklisierenden Zellen.

Bisher konnten der Literatur keine Angaben über posttranslationale Cdc45-Modifikationen entnommen werden. Daten dieser Arbeit deuten nun auf eine Ubiquitinierung des humanen Cdc45-Proteins und einen APC/C-vermittelten proteasomalen Abbau hin.

Die geringere Menge des Cdc45-Proteins im Vergleich zu Mcm-Proteinen in niederen eukaryotischen Organismen führte zur Annahme, dass Cdc45 der limitierende Faktor für die Initiation der DNA-Replikation ist. Obschon in der Literatur Daten zur Molekülzahl für humanes Mcm3 existierten (1.000.000), war keine Angabe für Cdc45 verfügbar. Um diese Informationslücke zu füllen, wurde die Molekülzahl des humanen Replikationsfaktors Cdc45 mit ungefähr 45.000 je Zelle bestimmt. Dieses Ergebnis zeigt, dass Cdc45 konserviert bis zum Säuger im Vergleich zu Mcms in deutlich geringerer Menge vorhanden ist, was zusätzlich die Idee untermauert, dass Cdc45 der Schlüsselfaktor für den eukaryotischen Initiationsprozess sein könnte.

Eine signifikant höhere Menge an Cdc45-Protein wurde in humanen Tumorzelllinien verschiedenster Ursprungsgewebe detektiert. Auffällig war hier besonders die Überexpression in Leukämie-Zelllinien.

Die Beschränkung der Existenz des essentiellen Replikationsfaktors Cdc45 auf wachsende Zellpopulationen eröffnet die Möglichkeit der Verknüpfung von Grundlagenforschung und klinischer Anwendung. Seit einigen Jahren werden ausgewählte Replikationsfaktoren als potentielle neue Proliferationsmarker in der Tumorphathologie getestet. Cdc45 könnte als aussichtsreicher Kandidat dieses Spektrum erweitern. Ein monoklonaler Cdc45-spezifischer Antikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich immunhistochemisch an Paraffin-Schnitten von normalem und malignem Gewebe eingesetzt. Weiterführende Analysen an anderen Tumorentitäten in Kombination mit etablierten Markern sind notwendig, um Cdc45 als potentiellen neuen Proliferationsmarker vorschlagen zu können.

6 Literaturverzeichnis

- Aboussekhra, A. & Wood, R. D.** (1995). Detection of nucleotide excision repair incisions in human fibroblasts by immunostaining for PCNA. *Exp Cell Res* 221, 326-32.
- Aguda, B. D.** (2001). Kick-starting the cell cycle: From growth-factor stimulation to initiation of DNA replication. *Chaos* 11, 269-276.
- Ait-Si-Ali, S., Guasconi, V., Fritsch, L., Yahi, H., Sekhri, R., Naguibneva, I., Robin, P., Cabon, F., Polesskaya, A. & Harel-Bellan, A.** (2004). A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *Embo J* 23, 605-15.
- Aktas, H., Cai, H. & Cooper, G. M.** (1997). Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol* 17, 3850-7.
- Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D. & Barrett, J. C.** (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13742-7.
- Alexandrow, M. G. & Hamlin, J. L.** (2005). Chromatin decondensation in S-phase involves recruitment of Cdk2 by Cdc45 and histone H1 phosphorylation. *J Cell Biol* 168, 875-86.
- Alison, M. R. & Lovell, M. J.** (2005). Liver cancer: the role of stem cells. *Cell Prolif* 38, 407-21.
- Almeida, A., Bolanos, J. P. & Moreno, S.** (2005). Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci* 25, 8115-21.
- Amati, B., Alevizopoulos, K. & Vlach, J.** (1998). Myc and the cell cycle. *Front Biosci* 3, d250-68.
- Aparicio, O. M., Stout, A. M. & Bell, S. P.** (1999). Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9130-5.
- Aparicio, O. M., Weinstein, D. M. & Bell, S. P.** (1997). Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell* 91, 59-69.
- Aparicio, T., Ibarra, A. & Mendez, J.** (2006). Cdc45-MCM-GINS, a new power player for DNA replication. *Cell Div* 1, 18.
- Araki, H., Leem, S. H., Phongdara, A. & Sugino, A.** (1995). Dpb11, which interacts with DNA polymerase II (epsilon) in *Saccharomyces cerevisiae*, has a dual role in S-phase progression and at a cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11791-5.
- Arata, Y., Fujita, M., Ohtani, K., Kijima, S. & Kato, J. Y.** (2000). Cdk2-dependent and -independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *J Biol Chem* 275, 6337-45.
- Asano, M. & Wharton, R. P.** (1999). E2F mediates developmental and cell cycle regulation of ORC1 in *Drosophila*. *Embo J* 18, 2435-48.
- Bachmair, A., Finley, D. & Varshavsky, A.** (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-86.
- Baker, T. A. & Bell, S. P.** (1998). Polymerases and the replisome: machines within machines. *Cell* 92, 295-305.
- Balajee, A. S. & Geard, C. R.** (2001). Chromatin-bound PCNA complex formation triggered by DNA damage occurs independent of the ATM gene product in human cells. *Nucleic Acids Res* 29, 1341-51.
- Baldini, A.** (1999). Is the genetic basis of DiGeorge syndrome in HAND? *Nat Genet* 21, 246-7.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. & Kouzarides, T.** (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-4.
- Bauerschmidt, C.** (2006). Der humane Replikationsfaktor Cdc45 - Lokalisation und Interaktionspartner -: Universität Jena, Dissertation.
- Bauerschmidt, C., Pollok, S., Kremmer, E., Nasheuer, H. P. & F., G.** (2007). Interactions of Human Cdc45 with the Mcm2-7 complex, the GINS complex and DNA polymerase δ and ϵ . *Genes Cells*.
- Beausejour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P. & Campisi, J.** (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* 22, 4212-22.
- Belhacene, N., Maulon, L., Guerin, S., Ricci, J. E., Mari, B., Colin, Y., Cartron, J. P. & Auburger, P.** (1998). Differential expression of the Kell blood group and CD10 antigens: two related membrane metalloproteinases during differentiation of K562 cells by phorbol ester and hemin. *FASEB J* 12, 531-9.
- Bell, S. P.** (2002). The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes Dev* 16, 659-72.
- Bell, S. P. & Dutta, A.** (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71, 333-74.
- Ben-Porath, I. & Weinberg, R. A.** (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 961-76.
- Bermejo, R., Vilaboa, N. & Cales, C.** (2002). Regulation of CDC6, geminin, and CDT1 in human cells that undergo polyploidization. *Mol Biol Cell* 13, 3989-4000.
- Bielas, J. H.** (2006). Non-transcribed strand repair revealed in quiescent cells. *Mutagenesis* 21, 49-53.
- Bielas, J. H. & Heddle, J. A.** (2004). Quiescent murine cells lack global genomic repair but are proficient in transcription-coupled repair. *DNA Repair (Amst)* 3, 711-7.
- Blain, S. W., Montalvo, E. & Massague, J.** (1997). Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J Biol Chem* 272, 25863-72.
- Blanchard, F., Rusiniak, M. E., Sharma, K., Sun, X., Todorov, I., Castellano, M. M., Gutierrez, C., Baumann, H. & Burhans, W. C.** (2002). Targeted destruction of DNA replication protein Cdc6 by cell death pathways in mammals and yeast. *Mol Biol Cell* 13, 1536-49.
- Blow, J. J.** (2001). Control of chromosomal DNA replication in the early *Xenopus* embryo. *Embo J* 20, 3293-7.
- Blow, J. J. & Hodgson, B.** (2002). Replication licensing--defining the proliferative state? *Trends Cell Biol* 12, 72-8.
- Bogan, J. A., Natale, D. A. & Depamphilis, M. L.** (2000). Initiation of eukaryotic DNA replication: conservative or liberal? *J Cell Physiol* 184, 139-50.
- Bonifacio, J. S.** (1998). Metabolic Labeling with Amino Acids. *Current Protocols in Cell Biology* 7.1.1-7.1.10.
- Bootsma, D., Budke, L. & Vos, O.** (1964). Studies on Synchronous Division of Tissue Culture Cells Initiated by Excess Thymidine. *Exp Cell Res* 33, 301-9.
- Bose, M. E., McConnell, K. H., Gardner-Aukema, K. A., Muller, U., Weinreich, M., Keck, J. L. & Fox, C. A.** (2004). The origin recognition complex and Sir4 protein recruit Sir1p to yeast silent chromatin through independent interactions requiring a common Sir1p domain. *Mol Cell Biol* 24, 774-86.

- Botz, J., Zeffass-Thome, K., Spitkovsky, D., Delius, H., Vogt, B., Eilers, M., Hatzigeorgiou, A. & Jansen-Durr, P.** (1996). Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter. *Mol Cell Biol* 16, 3401-9.
- Bracken, A. P., Ciro, M., Cocito, A. & Helin, K.** (2004). E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci* 29, 409-17.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Brake, T., Connor, J. P., Petereit, D. G. & Lambert, P. F.** (2003). Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human cervical cancer. *Cancer Res* 63, 8173-80.
- Brandeis, M. & Hunt, T.** (1996). The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *Embo J* 15, 5280-9.
- Brass, L. F. & Shattil, S. J.** (1988). Inhibition of thrombin-induced platelet activation by leupeptin. Implications for the participation of calpain in the initiation of platelet activation. *J Biol Chem* 263, 5210-6.
- Bravo, R. & Macdonald-Bravo, H.** (1987). Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 105, 1549-54.
- Bravou, V., Nishitani, H., Song, S. Y., Taraviras, S. & Varakis, J.** (2005). Expression of the licensing factors, Cdt1 and Geminin, in human colon cancer. *Int J Oncol* 27, 1511-8.
- Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. & Kouzarides, T.** (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597-601.
- Breitman, T. R., Selonick, S. E. & Collins, S. J.** (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2936-40.
- Bridger, J. M., Kill, I. R. & Lichter, P.** (1998). Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. *Chromosome Res* 6, 13-24.
- Brown, D. C. & Gatter, K. C.** (1990). Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 17, 489-503.
- Brown, G. W. & Kelly, T. J.** (1998). Purification of Hsk1, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem* 273, 22083-90.
- Brunk, U., Ericsson, J. L., Ponten, J. & Westermark, B.** (1973). Residual bodies and "aging" in cultured human glia cells. Effect of entrance into phase 3 and prolonged periods of confluence. *Exp Cell Res* 79, 1-14.
- Bruno, S., Gorczyca, W. & Darzynkiewicz, Z.** (1992). Effect of ionic strength in immunocytochemical detection of the proliferation associated nuclear antigens p120, PCNA, and the protein reacting with Ki-67 antibody. *Cytometry* 13, 496-501.
- Budarf, M. L. & Emanuel, B. S.** (1997). Progress in the autosomal segmental aneusomy syndromes (SASs): single or multi-locus disorders? *Hum Mol Genet* 6, 1657-65.
- Bukholm, I. R., Bukholm, G., Holm, R. & Nesland, J. M.** (2003). Association between histology grade, expression of HsMCM2, and cyclin A in human invasive breast carcinomas. *J Clin Pathol* 56, 368-73.
- Bullwinkel, J., Baron-Luhr, B., Ludemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J. & Scholzen, T.** (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 206, 624-35.
- Burkhardt, R., Schulte, D., Hu, D., Musahl, C., Gohring, F. & Knippers, R.** (1995). Interactions of human nuclear proteins P1Mcm3 and P1Cdc46. *Eur J Biochem* 228, 431-8.
- Bursch, W., Oberhammer, F. & Schulte-Hermann, R.** (1992). Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 13, 245-51.
- Calzada, A., Hodgson, B., Kanemaki, M., Bueno, A. & Labib, K.** (2005). Molecular anatomy and regulation of a stable replisome at a paused eukaryotic DNA replication fork. *Genes Dev* 19, 1905-19.
- Campbell, J. & Newlon, C.** (1991). Chromosomal DNA replication. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, vol. Vol. I (ed. J. R. Broach), pp. 41-146. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Campisi, J.** (1996). Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell* 84, 497-500.
- Campisi, J.** (1997a). Aging and cancer: the double-edged sword of replicative senescence. *J Am Geriatr Soc* 45, 482-8.
- Campisi, J.** (1997b). The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 33, 703-9.
- Campisi, J.** (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513-22.
- Carnero, A. & Hannon, G. J.** (1998). The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol* 227, 43-55.
- Celis, J. E. & Madsen, P.** (1986). Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS Lett* 209, 277-83.
- Chan, F. K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D. N. & Winoto, A.** (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol* 15, 2682-8.
- Chang, H. Y. & Yang, X.** (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 821-46.
- Chatrath, P., Scott, I. S., Morris, L. S., Davies, R. J., Rushbrook, S. M., Bird, K., Vowler, S. L., Grant, J. W., Saeed, I. T., Howard, D. et al.** (2003). Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki67 in laryngeal squamous epithelial lesions. *Br J Cancer* 89, 1048-54.
- Chen, J. H., Stoeber, K., Kingsbury, S., Ozanne, S. E., Williams, G. H. & Hales, C. N.** (2004). Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *J Biol Chem* 279, 49439-46.
- Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C. J. & Roussel, M. F.** (1998). Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1091-6.
- Chesnokov, I. N.** (2007). Multiple functions of the origin recognition complex. *Int Rev Cytol* 256, 69-109.
- Chou, D. M., Petersen, P., Walter, J. C. & Walter, G.** (2002). Protein phosphatase 2A regulates binding of Cdc45 to the prereplication complex. *J Biol Chem* 277, 40520-7.
- Christensen, T. W. & Tye, B. K.** (2003). Drosophila MCM10 interacts with members of the prereplication complex and is required for proper chromosome condensation. *Mol Biol Cell* 14, 2206-15.
- Clute, P. & Pines, J.** (1999). Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol* 1, 82-7.
- Coleman, N., Mills, A. D. & Laskey, R.** (2006). Cancer Diagnosis and DNA Replication. In *DNA Replication and Human Disease*, (ed. D. M.L.), pp. 501-18. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N. & Golub, T. R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3260-5.
- Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E. & Gallo, R. C. (1978). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2458-62.
- Cook, J. G., Chasse, D. A. & Nevins, J. R. (2004). The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 9625-33.
- Cooper, S. (2001). Revisiting the relationship of the mammalian G1 phase to cell differentiation. *J Theor Biol* 208, 399-402.
- Cortez, D., Glick, G. & Elledge, S. J. (2004). Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10078-83.
- Costanzo, V., Robertson, K., Ying, C. Y., Kim, E., Avvedimento, E., Gottesman, M., Grieco, D. & Gautier, J. (2000). Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage. *Mol Cell* 6, 649-59.
- Costanzo, V., Shechter, D., Lupardus, P. J., Cimprich, K. A., Gottesman, M. & Gautier, J. (2003). An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Mol Cell* 11, 203-13.
- Coverley, D., Kenny, M. K., Lane, D. P. & Wood, R. D. (1992). A role for the human single-stranded DNA binding protein HSSB/RPA in an early stage of nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* 20, 3873-80.
- Coverley, D., Pelizon, C., Trewick, S. & Laskey, R. A. (2000). Chromatin-bound Cdc6 persists in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a cyclin A-cdk2 dependent process. *J Cell Sci* 113 (Pt 11), 1929-38.
- Cox, J. A., Jeng, A. Y., Sharkey, N. A., Blumberg, P. M. & Tauber, A. I. (1985). Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C. *J Clin Invest* 76, 1932-8.
- Cromer, A., Carles, A., Millon, R., Ganguli, G., Chalmel, F., Lemaire, F., Young, J., Dembele, D., Thibault, C., Muller, D. et al. (2004). Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis. *Oncogene* 23, 2484-98.
- Curnutte, J. T., Erickson, R. W., Ding, J. & Badwey, J. A. (1994). Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester. *J Biol Chem* 269, 10813-9.
- Cvetic, C. A. & Walter, J. C. (2006). Getting a grip on licensing: mechanism of stable Mcm2-7 loading onto replication origins. *Mol Cell* 21, 143-4.
- Dalton, S. & Hopwood, B. (1997). Characterization of Cdc47p-minichromosome maintenance complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of Cdc45p as a subunit. *Mol Cell Biol* 17, 5867-75.
- Danis, E., Brodolin, K., Menut, S., Maiorano, D., Girard-Reydet, C. & Mechali, M. (2004). Specification of a DNA replication origin by a transcription complex. *Nat Cell Biol* 6, 721-30.
- Das, D., Pintucci, G. & Stern, A. (2000). MAPK-dependent expression of p21(WAF) and p27(kip1) in PMA-induced differentiation of HL60 cells. *FEBS Lett* 472, 50-2.
- Davis, P. K., Ho, A. & Dowdy, S. F. (2001). Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. *Biotechniques* 30, 1322-6, 1328, 1330-1.
- De Clercq, A. & Inze, D. (2006). Cyclin-dependent kinase inhibitors in yeast, animals, and plants: a functional comparison. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41, 293-313.
- De Falco, M., Ferrari, E., De Felice, M., Rossi, M., Hubscher, U. & Pisani, F. M. (2007). The human GINS complex binds to and specifically stimulates human DNA polymerase alpha-primase. *EMBO Rep* 8, 99-103.
- de Magalhaes, J. P. (2004). From cells to ageing: a review of models and mechanisms of cellular senescence and their impact on human ageing. *Exp Cell Res* 300, 1-10.
- DeGregori, J., Kowalik, T. & Nevins, J. R. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* 15, 4215-24.
- Dekker, L. V., Leitges, M., Altschuler, G., Mistry, N., McDermott, A., Roes, J. & Segal, A. W. (2000). Protein kinase C-beta contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem J* 347 Pt 1, 285-9.
- DePamphilis, M. L. (2003). The 'ORC cycle': a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. *Gene* 310, 1-15.
- Dhar, S. K., Yoshida, K., Machida, Y., Khaira, P., Chaudhuri, B., Wohlschlegel, J. A., Leffak, M., Yates, J. & Dutta, A. (2001). Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell* 106, 287-96.
- Dice, J. F. (1987). Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells. *Faseb J* 1, 349-57.
- Diehl, J. A., Zindy, F. & Sherr, C. J. (1997). Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 11, 957-72.
- Diffley, J. F., Cocker, J. H., Dowell, S. J. & Rowley, A. (1994). Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. *Cell* 78, 303-16.
- DiGeorge, A. (1968). Congenital absence of the thymus and its immunologic consequences: cocurrence with congenital hypoparathyroidism. *White Plains, NY: March of Dimes-Birth Defects Foundation:IV(1)*, 116-21.
- Dijkers, P. F., Medema, R. H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N. S., Lam, E. W., Burgering, B. M., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L. et al. (2000). Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol* 20, 9138-48.
- Dillin, A. & Rine, J. (1997). Separable functions of ORC5 in replication initiation and silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 147, 1053-62.
- Dimitrova, D. S., Todorov, I. T., Melendy, T. & Gilbert, D. M. (1999). Mcm2, but not RPA, is a component of the mammalian early G1-phase prereplication complex. *J Cell Biol* 146, 709-22.
- Dimri, G. P. (2005). What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell* 7, 505-12.
- Dimri, G. P., Hara, E. & Campisi, J. (1994). Regulation of two E2F-related genes in presenescent and senescent human fibroblasts. *J Biol Chem* 269, 16180-6.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-7.
- Dolan, W. P., Sherman, D. A. & Forsburg, S. L. (2004). *Schizosaccharomyces pombe* replication protein Cdc45/Sna41 requires Hsk1/Cdc7 and Rad4/Cut5 for chromatin binding. *Chromosoma* 113, 145-56.

- Dolbeare, F.** (1995). Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem J* 27, 339-69.
- Donhuijsen, K.** (1998). Histologisches Malignitätsgrading. *Deutsches Ärzteblatt* Heft 39, A-2391-95.
- Donovan, S., Harwood, J., Drury, L. S. & Diffley, J. F.** (1997). Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5611-6.
- Douglas, N. L., Dozier, S. K. & Donato, J. J.** (2005). Dual roles for Mcm10 in DNA replication initiation and silencing at the mating-type loci. *Mol Biol Rep* 32, 197-204.
- Drury, L. S., Perkins, G. & Diffley, J. F.** (1997). The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *Embo J* 16, 5966-76.
- du Manoir, S., Guillaud, P., Camus, E., Seigneurin, D. & Brugal, G.** (1991). Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry* 12, 455-63.
- Dudderidge, T. J., Stoeber, K., Loddo, M., Atkinson, G., Fanshawe, T., Griffiths, D. F. & Williams, G. H.** (2005). Mcm2, Geminin, and Ki67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11, 2510-7.
- Duronio, R. J., Bonnette, P. C. & O'Farrell, P. H.** (1998). Mutations of the Drosophila dDP, dE2F, and cyclin E genes reveal distinct roles for the E2F-DP transcription factor and cyclin E during the G1-S transition. *Mol Cell Biol* 18, 141-51.
- Dyson, N.** (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-62.
- Edwards, M. C., Tutter, A. V., Cvetic, C., Gilbert, C. H., Prokhorova, T. A. & Walter, J. C.** (2002). MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in Xenopus egg extracts. *J Biol Chem* 277, 33049-57.
- Ehrenhofer-Murray, A. E., Gossen, M., Pak, D. T., Botchan, M. R. & Rine, J.** (1995). Separation of origin recognition complex functions by cross-species complementation. *Science* 270, 1671-4.
- Ehrenhofer-Murray, A. E., Kamakaka, R. T. & Rine, J.** (1999). A role for the replication proteins PCNA, RF-C, polymerase epsilon and Cdc45 in transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 153, 1171-82.
- Eisenman, R. N.** (2001). Deconstructing myc. *Genes Dev* 15, 2023-30.
- Ekholm, S. V. & Reed, S. I.** (2000). Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12, 676-84.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B.** (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-25.
- Endl, E., Kausch, I., Baack, M., Knippers, R., Gerdes, J. & Scholzen, T.** (2001). The expression of Ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells. *J Pathol* 195, 457-62.
- Evan, G. I. & Vousden, K. H.** (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-8.
- Falck, J., Petrini, J. H., Williams, B. R., Lukas, J. & Bartek, J.** (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 30, 290-4.
- Fangman, W. L. & Brewer, B. J.** (1992). A question of time: replication origins of eukaryotic chromosomes. *Cell* 71, 363-6.
- Feng, D., Tu, Z., Wu, W. & Liang, C.** (2003). Inhibiting the expression of DNA replication-initiation proteins induces apoptosis in human cancer cells. *Cancer Res* 63, 7356-64.
- Fenteany, G. & Schreiber, S. L.** (1998). Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem* 273, 8545-8.
- Ferreira, M. F., Santocanale, C., Drury, L. S. & Diffley, J. F.** (2000). Dbf4p, an essential S phase-promoting factor, is targeted for degradation by the anaphase-promoting complex. *Mol Cell Biol* 20, 242-8.
- Ferreira, R., Magnaghi-Jaulin, L., Robin, P., Harel-Bellan, A. & Trouche, D.** (1998). The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10493-8.
- Ferreira, R., Naguibneva, I., Mathieu, M., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Pritchard, L. L. & Harel-Bellan, A.** (2001). Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep* 2, 794-9.
- Fien, K., Cho, Y. S., Lee, J. K., Raychaudhuri, S., Tappin, I. & Hurwitz, J.** (2004). Primer utilization by DNA polymerase alpha-primase is influenced by its interaction with Mcm10p. *J Biol Chem* 279, 16144-53.
- Fisher, D. & Mechali, M.** (2004). Sleeping policemen for DNA replication? *Nat Cell Biol* 6, 576-7.
- Forsburg, S. L.** (2004). Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 109-31.
- Fox, C. A., Ehrenhofer-Murray, A. E., Loo, S. & Rine, J.** (1997). The origin recognition complex, SIR1, and the S phase requirement for silencing. *Science* 276, 1547-51.
- Frame, S. & Balmain, A.** (2000). Integration of positive and negative growth signals during ras pathway activation in vivo. *Curr Opin Genet Dev* 10, 106-13.
- Frolov, M. V. & Dyson, N. J.** (2004). Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci* 117, 2173-81.
- Fuertes, G., Martin De Llano, J. J., Villarroja, A., Rivett, A. J. & Knecht, E.** (2003). Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J* 375, 75-86.
- Fujita, M., Kiyono, T., Hayashi, Y. & Ishibashi, M.** (1996). hCDC47, a human member of the MCM family. Dissociation of the nucleus-bound form during S phase. *J Biol Chem* 271, 4349-54.
- Funayama, R., Saito, M., Tanobe, H. & Ishikawa, F.** (2006). Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol* 175, 869-80.
- Furstenenthal, L., Kaiser, B. K., Swanson, C. & Jackson, P. K.** (2001). Cyclin E uses Cdc6 as a chromatin-associated receptor required for DNA replication. *J Cell Biol* 152, 1267-78.
- Galaktionov, K., Chen, X. & Beach, D.** (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 382, 511-7.
- Gambus, A., Jones, R. C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R. D. & Labib, K.** (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol* 8, 358-66.
- Garcia, P., Frampton, J., Ballester, A. & Cales, C.** (2000). Ectopic expression of cyclin E allows non-endomitotic megakaryoblastic K562 cells to establish re-replication cycles. *Oncogene* 19, 1820-33.

- Garg, P. & Burgers, P. M.** (2005). DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40, 115-28.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U. & Stein, H.** (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133, 1710-5.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. & Stein, H.** (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31, 13-20.
- Gieffers, C., Peters, B. H., Kramer, E. R., Dotti, C. G. & Peters, J. M.** (1999). Expression of the CDH1-associated form of the anaphase-promoting complex in postmitotic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11317-22.
- Gilbert, D. M.** (2001). Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science* 294, 96-100.
- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. & Lamb, N. J.** (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169-79.
- Glotzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. W.** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-8.
- Goldstein, S.** (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249, 1129-33.
- Gomez, E. B., Angeles, V. T. & Forsburg, S. L.** (2005). A screen for Schizosaccharomyces pombe mutants defective in rereplication identifies new alleles of rad4+, cut9+ and psf2+. *Genetics* 169, 77-89.
- Gonda, D. K., Bachmair, A., Wunning, I., Tobias, J. W., Lane, W. S. & Varshavsky, A.** (1989). Universality and structure of the N-end rule. *J Biol Chem* 264, 16700-12.
- Gonzalez, M. A., Pinder, S. E., Callagy, G., Vowler, S. L., Morris, L. S., Bird, K., Bell, J. A., Laskey, R. A. & Coleman, N.** (2003). Minichromosome maintenance protein 2 is a strong independent prognostic marker in breast cancer. *J Clin Oncol* 21, 4306-13.
- Gonzalez, M. A., Tachibana, K. E., Laskey, R. A. & Coleman, N.** (2005). Control of DNA replication and its potential clinical exploitation. *Nat Rev Cancer* 5, 135-41.
- Gonzalez, S., Klatt, P., Delgado, S., Conde, E., Lopez-Rios, F., Sanchez-Cespedes, M., Mendez, J., Antequera, F. & Serrano, M.** (2006). Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. *Nature* 440, 702-6.
- Gonzalez, S. & Serrano, M.** (2006). A new mechanism of inactivation of the INK4/ARF locus. *Cell Cycle* 5, 1382-4.
- Grabowski, B. & Kelman, Z.** (2003). Archeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context. *Annu Rev Microbiol* 57, 487-516.
- Grandori, C. & Eisenman, R. N.** (1997). Myc target genes. *Trends Biochem Sci* 22, 177-81.
- Greenberg, J. T., Guo, A., Klessig, D. F. & Ausubel, F. M.** (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77, 551-63.
- Gregan, J., Lindner, K., Brimage, L., Franklin, R., Namdar, M., Hart, E. A., Aves, S. J. & Kearsley, S. E.** (2003). Fission yeast Cdc23/Mcm10 functions after pre-replicative complex formation to promote Cdc45 chromatin binding. *Mol Biol Cell* 14, 3876-87.
- Grusch, M., Polgar, D., Gfatter, S., Leuhuber, K., Huettenbrenner, S., Leisser, C., Fuhrmann, G., Kassie, F., Steinkellner, H., Smid, K. et al.** (2002). Maintenance of ATP favours apoptosis over necrosis triggered by benzamide riboside. *Cell Death Differ* 9, 169-78.
- Grutzmann, R., Pilarsky, C., Ammerpohl, O., Luttges, J., Bohme, A., Sipos, B., Foerder, M., Alldinger, I., Jahnke, B., Schackert, H. K. et al.** (2004). Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays. *Neoplasia* 6, 611-22.
- Guan, K. L., Jenkins, C. W., Li, Y., Nichols, M. A., Wu, X., O'Keefe, C. L., Matera, A. G. & Xiong, Y.** (1994). Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 8, 2939-52.
- Ha, H. C. & Snyder, S. H.** (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13978-82.
- Hall, P. A. & Levison, D. A.** (1990). Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 43, 184-92.
- Hall, P. A. & Watt, F. M.** (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106, 619-33.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hand, R.** (1978). Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication. *Cell* 15, 317-25.
- Hannon, G. J. & Beach, D.** (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-61.
- Harbour, J. W. & Dean, D. C.** (2000). Chromatin remodeling and Rb activity. *Curr Opin Cell Biol* 12, 685-9.
- Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei Santi, A., Postigo, A. A. & Dean, D. C.** (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98, 859-69.
- Hardy, C. F.** (1997). Identification of Cdc45p, an essential factor required for DNA replication. *Gene* 187, 239-46.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J.** (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-16.
- Hashimoto, K., Araki, K., Osaki, M., Nakamura, H., Tomita, K., Shimizu, E. & Ito, H.** (2004). MCM2 and Ki-67 expression in human lung adenocarcinoma: prognostic implications. *Pathobiology* 71, 193-200.
- Hashimoto, Y. & Takisawa, H.** (2003). Xenopus Cut5 is essential for a CDK-dependent process in the initiation of DNA replication. *Embo J* 22, 2526-35.
- Hatakeyama, M., Brill, J. A., Fink, G. R. & Weinberg, R. A.** (1994). Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev* 8, 1759-71.
- Hateboer, G., Wobst, A., Petersen, B. O., Le Cam, L., Vigo, E., Sardet, C. & Helin, K.** (1998). Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F. *Mol Cell Biol* 18, 6679-97.
- Hayflick, L. & Moorhead, P. S.** (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Hecker, E.** (1985). Cell membrane associated protein kinase C as receptor of diterpene ester co-carcinogens of the tumor promoter type and the phenotypic expression of tumors. *Arzneimittelforschung* 35, 1890-903.
- Heidebrecht, H. J., Buck, F., Haas, K., Wacker, H. H. & Parwaresch, R.** (1996). Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif* 29, 413-25.
- Hendrickson, M., Madine, M., Dalton, S. & Gautier, J.** (1996). Phosphorylation of MCM4 by cdc2 protein kinase inhibits the activity of the minichromosome maintenance complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12223-8.

- Henglein, B., Chenivresse, X., Wang, J., Eick, D. & Brechot, C. (1994). Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5490-4.
- Hengst, L. & Reed, S. I. (1996). Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271, 1861-4.
- Hengst, L. & Reed, S. I. (1998). Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol* 227, 25-41.
- Hennessy, K. M., Lee, A., Chen, E. & Botstein, D. (1991). A group of interacting yeast DNA replication genes. *Genes Dev* 5, 958-69.
- Herbig, U. & Sedivy, J. M. (2006). Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev* 127, 16-24.
- Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J. F., Obaya, A. J., O'Connell, B. C., Mateyak, M. K., Tam, W., Kohlhuber, F. et al. (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2229-34.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-79.
- Hiebert, S. W., Lipp, M. & Nevins, J. R. (1989). E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3594-8.
- Higa, L. A., Mihaylov, I. S., Banks, D. P., Zheng, J. & Zhang, H. (2003). Radiation-mediated proteolysis of CDT1 by CUL4-ROC1 and CSN complexes constitutes a new checkpoint. *Nat Cell Biol* 5, 1008-15.
- Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J. Y., Ashmun, R. A. & Sherr, C. J. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 15, 2672-81.
- Hiraiwa, A., Fujita, M., Nagasaka, T., Adachi, A., Ohashi, M. & Ishibashi, M. (1997). Immunolocalization of hCDC47 protein in normal and neoplastic human tissues and its relation to growth. *Int J Cancer* 74, 180-4.
- Ho, A. & Dowdy, S. F. (2002). Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 12, 47-52.
- Homesley, L., Lei, M., Kawasaki, Y., Sawyer, S., Christensen, T. & Tye, B. K. (2000). Mcm10 and the MCM2-7 complex interact to initiate DNA synthesis and to release replication factors from origins. *Genes Dev* 14, 913-26.
- Honeycutt, K. A., Chen, Z., Koster, M. I., Miers, M., Nuchtern, J., Hicks, J., Roop, D. R. & Shohet, J. M. (2006). Deregulated minichromosomal maintenance protein MCM7 contributes to oncogene driven tumorigenesis. *Oncogene* 25, 4027-32.
- Hopwood, B. & Dalton, S. (1996). Cdc45p assembles into a complex with Cdc46p/Mcm5p, is required for minichromosome maintenance, and is essential for chromosomal DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12309-14.
- Howard, A. & Pelc, S. R. (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity (Lond) Suppl.*, 261-73.
- Hsu, H. C., Stillman, B. & Xu, R. M. (2005). Structural basis for origin recognition complex 1 protein-silence information regulator 1 protein interaction in epigenetic silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8519-24.
- Hsu, S. M., Raine, L. & Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577-80.
- Hu, B., Burkhardt, R., Schulte, D., Musahl, C. & Knippers, R. (1993). The P1 family: a new class of nuclear mammalian proteins related to the yeast Mcm replication proteins. *Nucleic Acids Res* 21, 5289-93.
- Huang, D., Jokela, M., Tuusa, J., Skog, S., Poikonen, K. & Syvaaja, J. E. (2001). E2F mediates induction of the Sp1-controlled promoter of the human DNA polymerase epsilon B-subunit gene POLE2. *Nucleic Acids Res* 29, 2810-21.
- Huang, D. W., Fanti, L., Pak, D. T., Botchan, M. R., Pimpinelli, S. & Kellum, R. (1998). Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of Drosophila heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins. *J Cell Biol* 142, 307-18.
- Huang, D. Y. & Prystowsky, M. B. (1996). Identification of an essential cis-element near the transcription start site for transcriptional activation of the proliferating cell nuclear antigen gene. *J Biol Chem* 271, 1218-25.
- Huberman, E. & Callahan, M. F. (1979). Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1293-7.
- Hubscher, U., Maga, G. & Spadari, S. (2002). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* 71, 133-63.
- Hubscher, U., Nasheuer, H. P. & Syvaaja, J. E. (2000). Eukaryotic DNA polymerases, a growing family. *Trends Biochem Sci* 25, 143-7.
- Hunt, D. P., Freeman, A., Morris, L. S., Burnet, N. G., Bird, K., Davies, T. W., Laskey, R. A. & Coleman, N. (2002). Early recurrence of benign meningioma correlates with expression of mini-chromosome maintenance-2 protein. *Br J Neurosurg* 16, 10-5.
- Hunter, T. & Pines, J. (1994). Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79, 573-82.
- Hurlin, P. J., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Eisenman, R. N. (1999). Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. *Embo J* 18, 7019-28.
- Hyrien, O., Marheineke, K. & Goldar, A. (2003). Paradoxes of eukaryotic DNA replication: MCM proteins and the random completion problem. *Bioessays* 25, 116-25.
- Hyrien, O. & Mechali, M. (1993). Chromosomal replication initiates and terminates at random sequences but at regular intervals in the ribosomal DNA of *Xenopus* early embryos. *Embo J* 12, 4511-20.
- Ishimi, Y. (1997). A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem* 272, 24508-13.
- Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., You, Z., Omori, A. & Kitagawa, M. (2000). Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2. *J Biol Chem* 275, 16235-41.
- Ishimi, Y., Okayasu, I., Kato, C., Kwon, H. J., Kimura, H., Yamada, K. & Song, S. Y. (2003). Enhanced expression of Mcm proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur J Biochem* 270, 1089-101.
- Iwata, K., Ogata, S., Okumura, K. & Taguchi, H. (2003). Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line by niacin-related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 1132-5.
- Iyer, V. R., Eisen, M. B., Ross, D. T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J. C., Trent, J. M., Staudt, L. M., Hudson, J., Jr., Boguski, M. S. et al. (1999). The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283, 83-7.
- Izumi, M., Yatagai, F. & Hanaoka, F. (2001). Cell cycle-dependent proteolysis and phosphorylation of human Mcm10. *J Biol Chem* 276, 48526-31.
- Jackman, J. & O'Connor, P. M. (1998). Methods for Synchronizing Cells at Specific Stages of the Cell Cycle. *Current Protocols in Cell Biology* 8.3.1-8.2.20.

- Jackson, A. L., Pahl, P. M., Harrison, K., Rosamond, J. & Sclafani, R. A. (1993). Cell cycle regulation of the yeast Cdc7 protein kinase by association with the Dbf4 protein. *Mol Cell Biol* 13, 2899-908.
- Jares, P. & Blow, J. J. (2000). Xenopus cdc7 function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading. *Genes Dev* 14, 1528-40.
- Jiang, H., Lin, J., Su, Z. Z., Collart, F. R., Huberman, E. & Fisher, P. B. (1994). Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* 9, 3397-406.
- Jiang, W., McDonald, D., Hope, T. J. & Hunter, T. (1999a). Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication. *Embo J* 18, 5703-13.
- Jiang, W., Wells, N. J. & Hunter, T. (1999b). Multistep regulation of DNA replication by Cdk phosphorylation of HsCdc6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6193-8.
- Jones, D. O., Mattei, M. G., Horsley, D., Cowell, I. G. & Singh, P. B. (2001). The gene and pseudogenes of Cbx3/mHP1 gamma. *DNA Seq* 12, 147-60.
- Juan, G., Traganos, F. & Darzynkiewicz, Z. (1999). Histone H3 phosphorylation in human monocytes and during HL-60 cell differentiation. *Exp Cell Res* 246, 212-20.
- Kaelin, W. G., Jr. (1999). Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* 21, 950-8.
- Kamimura, Y., Masumoto, H., Sugino, A. & Araki, H. (1998). Sld2, which interacts with Dpb11 in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for chromosomal DNA replication. *Mol Cell Biol* 18, 6102-9.
- Kamimura, Y., Tak, Y. S., Sugino, A. & Araki, H. (2001). Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 20, 2097-107.
- Kaneki, M., Kharbanda, S., Pandey, P., Yoshida, K., Takekawa, M., Liou, J. R., Stone, R. & Kufe, D. (1999). Functional role for protein kinase Cbeta as a regulator of stress-activated protein kinase activation and monocytic differentiation of myeloid leukemia cells. *Mol Cell Biol* 19, 461-70.
- Kanemaki, M., Sanchez-Diaz, A., Gambus, A. & Labib, K. (2003). Functional proteomic identification of DNA replication proteins by induced proteolysis in vivo. *Nature* 423, 720-4.
- Karakaidos, P., Taraviras, S., Vassiliou, L. V., Zacharatos, P., Kastrinakis, N. G., Kougiou, D., Kouloukoussa, M., Nishitani, H., Papavassiliou, A. G., Lygerou, Z. et al. (2004). Overexpression of the replication licensing regulators hCdt1 and hCdc6 characterizes a subset of non-small-cell lung carcinomas: synergistic effect with mutant p53 on tumor growth and chromosomal instability--evidence of E2F-1 transcriptional control over hCdt1. *Am J Pathol* 165, 1351-65.
- Karlsson, J., Rotheneder, H. & Wintersberger, E. (1996). Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol Cell Biol* 16, 1659-67.
- Kato, H., Miyazaki, T., Fukai, Y., Nakajima, M., Sohda, M., Takita, J., Masuda, N., Fukuchi, M., Manda, R., Ojima, H. et al. (2003). A new proliferation marker, minichromosome maintenance protein 2, is associated with tumor aggressiveness in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 84, 24-30.
- Katou, Y., Kanoh, Y., Bando, M., Noguchi, H., Tanaka, H., Ashikari, T., Sugimoto, K. & Shirahige, K. (2003). S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature* 424, 1078-83.
- Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. & Poirier, G. G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53, 3976-85.
- Kawasaki, Y., Hiraga, S. & Sugino, A. (2000). Interactions between Mcm10p and other replication factors are required for proper initiation and elongation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 5, 975-89.
- Kawasaki, Y. & Sugino, A. (2001). Yeast replicative DNA polymerases and their role at the replication fork. *Mol Cells* 12, 277-85.
- Kearsey, S. E. & Cotterill, S. (2003). Enigmatic variations: divergent modes of regulating eukaryotic DNA replication. *Mol Cell* 12, 1067-75.
- Kel, A. E., Kel-Margoulis, O. V., Farnham, P. J., Bartley, S. M., Wingender, E. & Zhang, M. Q. (2001). Computer-assisted identification of cell cycle-related genes: new targets for E2F transcription factors. *J Mol Biol* 309, 99-120.
- Kelly, T. J. & Brown, G. W. (2000). Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem* 69, 829-80.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.
- Kim, S., Dallmann, H. G., McHenry, C. S. & Marians, K. J. (1996). Coupling of a replicative polymerase and helicase: a tau-DnaB interaction mediates rapid replication fork movement. *Cell* 84, 643-50.
- Kingsbury, S. R., Loddo, M., Fanshawe, T., Obermann, E. C., Prevost, A. T., Stoeber, K. & Williams, G. H. (2005). Repression of DNA replication licensing in quiescence is independent of geminin and may define the cell cycle state of progenitor cells. *Exp Cell Res* 309, 56-67.
- Kneissl, M., Putter, V., Szalay, A. A. & Grummt, F. (2003). Interaction and assembly of murine pre-replicative complex proteins in yeast and mouse cells. *J Mol Biol* 327, 111-28.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J. P., Gannon, J. & Hunt, T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* 3, 1279-94.
- Koeffler, H. P., Bar-Eli, M. & Territo, M. C. (1981). Phorbol ester effect on differentiation of human myeloid leukemia cell lines blocked at different stages of maturation. *Cancer Res* 41, 919-26.
- Koff, A., Cross, F., Fisher, A., Schumacher, J., Leguellec, K., Philippe, M. & Roberts, J. M. (1991). Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 66, 1217-28.
- Kreitz, S., Ritz, M., Baack, M. & Knippers, R. (2001). The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J Biol Chem* 276, 6337-42.
- Krude, T., Musahl, C., Laskey, R. A. & Knippers, R. (1996). Human replication proteins hCdc21, hCdc46 and P1Mcm3 bind chromatin uniformly before S-phase and are displaced locally during DNA replication. *J Cell Sci* 109 (Pt 2), 309-18.
- Kruger, S., Thorns, C., Stocker, W., Muller-Kunert, E., Bohle, A. & Feller, A. C. (2003). Prognostic value of MCM2 immunoreactivity in stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 43, 138-45.
- Kubota, Y., Takase, Y., Komori, Y., Hashimoto, Y., Arata, T., Kamimura, Y., Araki, H. & Takisawa, H. (2003). A novel ring-like complex of Xenopus proteins essential for the initiation of DNA replication. *Genes Dev* 17, 1141-52.
- Kukimoto, I., Igaki, H. & Kanda, T. (1999). Human CDC45 protein binds to minichromosome maintenance 7 protein and the p70 subunit of DNA polymerase alpha. *Eur J Biochem* 265, 936-43.

- Kumagai, A. & Dunphy, W. G.** (2000). Claspins, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 6, 839-49.
- Kumagai, H., Sato, N., Yamada, M., Mahony, D., Seghezzi, W., Lees, E., Arai, K. & Masai, H.** (1999). A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 19, 5083-95.
- Kumar, S. & Lavin, M. F.** (1996). The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell Death Differ* 3, 255-67.
- La Thangue, N. B.** (2002). Transcription. Chromatin control--a place for E2F and Myc to meet. *Science* 296, 1034-5.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T.** (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-20.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lajtha, L. G.** (1979). Haemopoietic stem cells: concept and definitions. *Blood Cells* 5, 447-55.
- Laskey, R.** (2000). Initiation of DNA replication in normal and neoplastic cells. In *Fifth Congress of the European Haematology Association Birmingham, UK, 25-28 June 2000; Session 11 - Cell Cycle*.
- Laskey, R.** (2005). The Croonian Lecture 2001 hunting the antisocial cancer cell: MCM proteins and their exploitation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 1119-32.
- Laskey, R. A. & Madine, M. A.** (2003). A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks. *EMBO Rep* 4, 26-30.
- Lea, N. C., Orr, S. J., Stoeber, K., Williams, G. H., Lam, E. W., Ibrahim, M. A., Mufti, G. J. & Thomas, N. S.** (2003). Commitment point during G0->G1 that controls entry into the cell cycle. *Mol Cell Biol* 23, 2351-61.
- Lee, D. H. & Goldberg, A. L.** (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8, 397-403.
- Lee, J. K. & Hurwitz, J.** (2001). Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 54-9.
- Lee, M. H., Reynisdottir, I. & Massague, J.** (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9, 639-49.
- Lees, E. M. & Harlow, E.** (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol* 13, 1194-201.
- Lei, M.** (2005). The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 5, 365-80.
- Lei, M., Kawasaki, Y. & Tye, B. K.** (1996). Physical interactions among Mcm proteins and effects of Mcm dosage on DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 5081-90.
- Lei, M., Kawasaki, Y., Young, M. R., Kihara, M., Sugino, A. & Tye, B. K.** (1997). Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis. *Genes Dev* 11, 3365-74.
- Lei, M. & Tye, B. K.** (2001). Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* 114, 1447-54.
- Lelle, R. J., Heidenreich, W., Stauch, G. & Gerdes, J.** (1987). The correlation of growth fractions with histologic grading and lymph node status in human mammary carcinoma. *Cancer* 59, 83-8.
- Leone, G., DeGregori, J., Yan, Z., Jakoi, L., Ishida, S., Williams, R. S. & Nevins, J. R.** (1998). E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev* 12, 2120-30.
- Lepke, M., Putter, V., Staib, C., Kneissl, M., Berger, C., Hoehn, K., Nanda, I., Schmid, M. & Grummt, F.** (1999). Identification, characterization and chromosomal localization of the cognate human and murine DBF4 genes. *Mol Gen Genet* 262, 220-9.
- Levy, F., Johnsson, N., Rumenapf, T. & Varshavsky, A.** (1996). Using ubiquitin to follow the metabolic fate of a protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4907-12.
- Li, S. S., Xue, W. C., Khoo, U. S., Ngan, H. Y., Chan, K. Y., Tam, I. Y., Chiu, P. M., Ip, P. P., Tam, K. F. & Cheung, A. N.** (2005). Replicative MCM7 protein as a proliferation marker in endometrial carcinoma: a tissue microarray and clinicopathological analysis. *Histopathology* 46, 307-13.
- Li, X., Zhao, Q., Liao, R., Sun, P. & Wu, X.** (2003a). The SCF(Skp2) ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation. *J Biol Chem* 278, 30854-8.
- Li, Y. Y., Wang, L. & Lu, C. D.** (2003b). An E2F site in the 5'-promoter region contributes to serum-dependent up-regulation of the human proliferating cell nuclear antigen gene. *FEBS Lett* 544, 112-8.
- Liachko, I. & Tye, B. K.** (2005). Mcm10 is required for the maintenance of transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 171, 503-15.
- Liang, C. & Stillman, B.** (1997). Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes Dev* 11, 3375-86.
- Liao, H., Winkfein, R. J., Mack, G., Rattner, J. B. & Yen, T. J.** (1995). CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol* 130, 507-18.
- Lin, X. H., Walter, J., Scheidtmann, K., Ohst, K., Newport, J. & Walter, G.** (1998). Protein phosphatase 2A is required for the initiation of chromosomal DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14693-8.
- Liu, P., Barkley, L. R., Day, T., Bi, X., Slater, D. M., Alexandrow, M. G., Nasheuer, H. P. & Vaziri, C.** (2006). The Chk1-mediated S-phase checkpoint targets initiation factor Cdc45 via a Cdc25A/Cdk2-independent mechanism. *J Biol Chem* 281, 30631-44.
- Liu, W. & Linn, S.** (2000). Proteolysis of the human DNA polymerase epsilon catalytic subunit by caspase-3 and calpain specifically during apoptosis. *Nucleic Acids Res* 28, 4180-8.
- Loebel, D., Huikeshoven, H. & Cotterill, S.** (2000). Localisation of the DmCdc45 DNA replication factor in the mitotic cycle and during chorion gene amplification. *Nucleic Acids Res* 28, 3897-903.
- Loupart, M. L., Krause, S. A. & Heck, M. S.** (2000). Aberrant replication timing induces defective chromosome condensation in *Drosophila* ORC2 mutants. *Curr Biol* 10, 1547-56.
- Lukas, J., Lukas, C. & Bartek, J.** (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 3, 997-1007.

- Lundberg, A. S., Hahn, W. C., Gupta, P. & Weinberg, R. A. (2000). Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol* 12, 705-9.
- Lundberg, A. S. & Weinberg, R. A. (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 18, 753-61.
- MacCallum, D. E. & Hall, P. A. (2000). The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol* 190, 537-44.
- Machida, Y. J., Hamlin, J. L. & Dutta, A. (2005). Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* 123, 13-24.
- Madine, M. A., Khoo, C. Y., Mills, A. D., Musahl, C. & Laskey, R. A. (1995). The nuclear envelope prevents reinitiation of replication by regulating the binding of MCM3 to chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol* 5, 1270-9.
- Madine, M. A., Swietlik, M., Pelizon, C., Romanowski, P., Mills, A. D. & Laskey, R. A. (2000). The roles of the MCM, ORC, and Cdc6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. *J Struct Biol* 129, 198-210.
- Maga, G. & Hubscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116, 3051-60.
- Mahbubani, H. M., Chong, J. P., Chevalier, S., Thommes, P. & Blow, J. J. (1997). Cell cycle regulation of the replication licensing system: involvement of a Cdk-dependent inhibitor. *J Cell Biol* 136, 125-35.
- Maiorano, D., Rul, W. & Mechali, M. (2004). Cell cycle regulation of the licensing activity of Cdt1 in *Xenopus laevis*. *Exp Cell Res* 295, 138-49.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30, 630-41.
- Marheineke, K. & Hyrien, O. (2004). Control of replication origin density and firing time in *Xenopus* egg extracts: role of a caffeine-sensitive, ATR-dependent checkpoint. *J Biol Chem* 279, 28071-81.
- Markey, M., Siddiqui, H. & Knudsen, E. S. (2004). Geminin is targeted for repression by the retinoblastoma tumor suppressor pathway through intragenic E2F sites. *J Biol Chem* 279, 29255-62.
- Marks, F. & Gschwendt, M. (1995). Protein kinase C and skin tumor promotion. *Mutat Res* 333, 161-72.
- Marshall, C. (1999). How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* 11, 732-6.
- Masai, H., Taniyama, C., Ogino, K., Matsui, E., Kakusho, N., Matsumoto, S., Kim, J. M., Ishii, A., Tanaka, T., Kobayashi, T. et al. (2006). Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 kinase facilitates its interaction with Cdc45 on the chromatin. *J Biol Chem* 281, 39249-61.
- Masuda, T., Mimura, S. & Takisawa, H. (2003). CDK- and Cdc45-dependent priming of the MCM complex on chromatin during S-phase in *Xenopus* egg extracts: possible activation of MCM helicase by association with Cdc45. *Genes Cells* 8, 145-61.
- Masumoto, H., Muramatsu, S., Kamimura, Y. & Araki, H. (2002). S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Nature* 415, 651-5.
- Masumoto, H., Sugino, A. & Araki, H. (2000). Dpb11 controls the association between DNA polymerases alpha and epsilon and the autonomously replicating sequence region of budding yeast. *Mol Cell Biol* 20, 2809-17.
- Matsunaga, F., Forterre, P., Ishino, Y. & Myllykallio, H. (2001). In vivo interactions of archaeal Cdc6/Orc1 and minichromosome maintenance proteins with the replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11152-7.
- Matsuoka, S., Edwards, M. C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J. W. & Elledge, S. J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9, 650-62.
- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J. & Kato, J. Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14, 2066-76.
- McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S. & Peters, G. (1998). Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr Biol* 8, 351-4.
- McFarlane, R. J., Carr, A. M. & Price, C. (1997). Characterisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rad4/cut5 mutant phenotypes: dissection of DNA replication and G2 checkpoint control function. *Mol Gen Genet* 255, 332-40.
- McGarry, T. J. & Kirschner, M. W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* 93, 1043-53.
- McKie, J. M., Wadey, R. B., Sutherland, H. F., Taylor, C. L. & Scambler, P. J. (1998). Direct selection of conserved cDNAs from the DiGeorge critical region: isolation of a novel CDC45-like gene. *Genome Res* 8, 834-41.
- Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L. & Burgering, B. M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782-7.
- Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* 55, 663-700.
- Mendez, J. & Stillman, B. (2000). Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* 20, 8602-12.
- Meng, M. V., Grossfeld, G. D., Williams, G. H., Dilworth, S., Stoeber, K., Mulley, T. W., Weinberg, V., Carroll, P. R. & Tlsty, T. D. (2001). Minichromosome maintenance protein 2 expression in prostate: characterization and association with outcome after therapy for cancer. *Clin Cancer Res* 7, 2712-8.
- Merrill, G. F. (1998). Cell synchronization. *Methods Cell Biol* 57, 229-49.
- Meyer, W. H. & Howard, T. H. (1983). Changes in actin content during induced myeloid maturation of human promyelocytes. *Blood* 62, 308-14.
- Meyerson, M. & Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14, 2077-86.
- Mimnaugh, E. G., Bonvini, P. & Neckers, L. (1999). The measurement of ubiquitin and ubiquitinated proteins. *Electrophoresis* 20, 418-28.
- Mimura, S., Masuda, T., Matsui, T. & Takisawa, H. (2000). Central role for cdc45 in establishing an initiation complex of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Genes Cells* 5, 439-52.
- Mimura, S. & Takisawa, H. (1998). *Xenopus* Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *Embo J* 17, 5699-707.

- Miura, M., Domon, M., Sasaki, T., Kondo, S. & Takasaki, Y. (1992). Two types of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) complex formation in quiescent normal and xeroderma pigmentosum group A fibroblasts following ultraviolet light (uv) irradiation. *Exp Cell Res* 201, 541-4.
- Miyake, S. & Yamashita, S. (1998). Identification of sna41 gene, which is the suppressor of nda4 mutation and is involved in DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 3, 157-66.
- Moir, D., Stewart, S. E., Osmond, B. C. & Botstein, D. (1982). Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* 100, 547-63.
- Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A. C., Draetta, G. F., Hershko, A. & Pagano, M. (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 13, 1181-9.
- Moore, A. L. & Wang, T. S. (1994). Down-regulation of genes encoding DNA replication proteins during cell cycle exit. *Cell Growth Differ* 5, 485-94.
- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-4.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-91.
- Morkel, M., Wenkel, J., Bannister, A. J., Kouzarides, T. & Hagemeyer, C. (1997). An E2F-like repressor of transcription. *Nature* 390, 567-8.
- Moyer, S. E., Lewis, P. W. & Botchan, M. R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10236-41.
- Mulligan, G. & Jacks, T. (1998). The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet* 14, 223-9.
- Murakami, Y. & Hurwitz, J. (1993). DNA polymerase alpha stimulates the ATP-dependent binding of simian virus tumor T antigen to the SV40 origin of replication. *J Biol Chem* 268, 11018-27.
- Murphy, N., Ring, M., Heffron, C. C., Martin, C. M., McGuinness, E., Sheils, O. & O'Leary, J. J. (2005). Quantitation of CDC6 and MCM5 mRNA in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Mod Pathol* 18, 844-9.
- Musahl, C., Holthoff, H. P., Lesch, R. & Knippers, R. (1998). Stability of the replicative Mcm3 protein in proliferating and differentiating human cells. *Exp Cell Res* 241, 260-4.
- Myster, D. L. & Duronio, R. J. (2000). To differentiate or not to differentiate? *Curr Biol* 10, R302-4.
- Myung, J., Kim, K. B. & Crews, C. M. (2001). The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev* 21, 245-73.
- Nakajima, R. & Masukata, H. (2002). SpSld3 is required for loading and maintenance of SpCdc45 on chromatin in DNA replication in fission yeast. *Mol Biol Cell* 13, 1462-72.
- Nakayama, K. I. & Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 369-81.
- Nakayasu, H. & Berezney, R. (1989). Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J Cell Biol* 108, 1-11.
- Narita, M. & Lowe, S. W. (2004). Executing cell senescence. *Cell Cycle* 3, 244-6.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J. & Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-16.
- Neben, K., Korshunov, A., Benner, A., Wrobel, G., Hahn, M., Kokocinski, F., Golanov, A., Joos, S. & Lichter, P. (2004). Microarray-based screening for molecular markers in medulloblastoma revealed STK15 as independent predictor for survival. *Cancer Res* 64, 3103-11.
- Neuman, E., Flemington, E. K., Sellers, W. R. & Kaelin, W. G., Jr. (1994). Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter. *Mol Cell Biol* 14, 6607-15.
- Nicholson, D. W. & Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.
- Nicolas, E., Roumillac, C. & Trouche, D. (2003). Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol* 23, 1614-22.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. & Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-9.
- Nicotera, P. & Leist, M. (1997). Energy supply and the shape of death in neurons and lymphoid cells. *Cell Death Differ* 4, 435-42.
- Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E. et al. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561-5.
- Nishitani, H., Lygerou, Z. & Nishimoto, T. (2004). Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of geminin through its N-terminal region. *J Biol Chem* 279, 30807-16.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. & Nurse, P. (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* 404, 625-8.
- Nishitani, H., Taraviras, S., Lygerou, Z. & Nishimoto, T. (2001). The human licensing factor for DNA replication Cdt1 accumulates in G1 and is destabilized after initiation of S-phase. *J Biol Chem* 276, 44905-11.
- Nitani, N., Nakamura, K., Nakagawa, C., Masukata, H. & Nakagawa, T. (2006). Regulation of DNA replication machinery by Mrc1 in fission yeast. *Genetics* 174, 155-65.
- Nougarede, R., Della Seta, F., Zarrov, P. & Schwob, E. (2000). Hierarchy of S-phase-promoting factors: yeast Dbf4-Cdc7 kinase requires prior S-phase cyclin-dependent kinase activation. *Mol Cell Biol* 20, 3795-806.
- Nurse, P. (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79, 547-50.
- Obaya, A. J., Mateyak, M. K. & Sedivy, J. M. (1999). Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* 18, 2934-41.
- Oehlmann, M., Score, A. J. & Blow, J. J. (2004). The role of Cdc6 in ensuring complete genome licensing and S phase checkpoint activation. *J Cell Biol* 165, 181-90.
- Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D. M. & Nakatani, Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296, 1132-6.
- Ohkuma, S. & Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3327-31.
- Ohta, S., Tatsumi, Y., Fujita, M., Tsurimoto, T. & Obuse, C. (2003). The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle. *J Biol Chem* 278, 41535-40.
- Ohtani, K. (1999). Implication of transcription factor E2F in regulation of DNA replication. *Front Biosci* 4, D793-804.

- Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D. R., Kelly, T. J. & Nevins, J. R. (1996). Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Mol Cell Biol* 16, 6977-84.
- Ohtani, K., Iwanaga, R., Nakamura, M., Ikeda, M., Yabuta, N., Tsuruga, H. & Nojima, H. (1999). Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene* 18, 2299-309.
- Ohtani, K., Tsujimoto, A., Ikeda, M. & Nakamura, M. (1998). Regulation of cell growth-dependent expression of mammalian CDC6 gene by the cell cycle transcription factor E2F. *Oncogene* 17, 1777-85.
- Ohtsubo, M. & Roberts, J. M. (1993). Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259, 1908-12.
- Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M. & Pagano, M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15, 2612-24.
- O'Keefe, R. T., Henderson, S. C. & Spector, D. L. (1992). Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J Cell Biol* 116, 1095-110.
- Olins, A. L., Herrmann, H., Lichter, P. & Olins, D. E. (2000). Retinoic acid differentiation of HL-60 cells promotes cytoskeletal polarization. *Exp Cell Res* 254, 130-42.
- Osborn, A. J. & Elledge, S. J. (2003). Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53. *Genes Dev* 17, 1755-67.
- Owens, J. C., Detweiler, C. S. & Li, J. J. (1997). CDC45 is required in conjunction with CDC7/DBF4 to trigger the initiation of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12521-6.
- Pacek, M., Tutter, A. V., Kubota, Y., Takisawa, H. & Walter, J. C. (2006). Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell* 21, 581-7.
- Pacek, M. & Walter, J. C. (2004). A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *Embo J* 23, 3667-76.
- Padmanabhan, V., Callas, P., Philips, G., Trainer, T. D. & Beatty, B. G. (2004). DNA replication regulation protein Mcm7 as a marker of proliferation in prostate cancer. *J Clin Pathol* 57, 1057-62.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. & Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* 11, 961-71.
- Pagano, M., Tam, S. W., Theodoras, A. M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P. R., Draetta, G. F. & Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269, 682-5.
- Painter, R. B. & Young, B. R. (1976). Formation of nascent DNA molecules during inhibition of replicon initiation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 418, 146-53.
- Pak, D. T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D. W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P. & Botchan, M. R. (1997). Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* 91, 311-23.
- Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-8.
- Pearson, B. E., Nasheuer, H. P. & Wang, T. S. (1991). Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol Cell Biol* 11, 2081-95.
- Pelizon, C., d'Adda di Fagnana, F., Farrace, L. & Laskey, R. A. (2002). Human replication protein Cdc6 is selectively cleaved by caspase 3 during apoptosis. *EMBO Rep* 3, 780-4.
- Pellicciari, C., Mangiarotti, R., Bottone, M. G., Danova, M. & Wang, E. (1995). Identification of resting cells by dual-parameter flow cytometry of statin expression and DNA content. *Cytometry* 21, 329-37.
- Perez-Roger, I., Solomon, D. L., Sewing, A. & Land, H. (1997). Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene* 14, 2373-81.
- Perkins, G., Drury, L. S. & Diffley, J. F. (2001). Separate SCF(CDC4) recognition elements target Cdc6 for proteolysis in S phase and mitosis. *Embo J* 20, 4836-45.
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J. & Helin, K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/Cdk2 regulates its subcellular localization. *Embo J* 18, 396-410.
- Petersen, B. O., Wagener, C., Marinoni, F., Kramer, E. R., Melixetian, M., Lazzerini Denchi, E., Gieffers, C., Matteucci, C., Peters, J. M. & Helin, K. (2000). Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. *Genes Dev* 14, 2330-43.
- Petersen, P., Chou, D. M., You, Z., Hunter, T., Walter, J. C. & Walter, G. (2006). Protein phosphatase 2A antagonizes ATM and ATR- and Cdc7-independent DNA damage checkpoint. *Mol Cell Biol* 26, 1997-2011.
- Pfleger, C. M. & Kirschner, M. W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* 14, 655-65.
- Pfleger, C. M., Lee, E. & Kirschner, M. W. (2001). Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 15, 2396-407.
- Pflumm, M. F. & Botchan, M. R. (2001). Orc mutants arrest in metaphase with abnormally condensed chromosomes. *Development* 128, 1697-707.
- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-33.
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 308 (Pt 3), 697-711.
- Podlich, D. & Kemme, M. (2000). Expression of human tissue kallikrein in differentiated HL-60 cells. *Biol Chem* 381, 629-32.
- Pollak, S., Stoepl, J., Bauerschmidt, C., Kremmer, E. & Nasheuer, H. P. (2003). Regulation of eukaryotic DNA replication at the initiation step. *Biochem Soc Trans* 31, 266-9.
- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M. & Koff, A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8, 9-22.
- Prasanth, S. G., Prasanth, K. V., Siddiqui, K., Spector, D. L. & Stillman, B. (2004). Human Orc2 localizes to centromeres, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *Embo J* 23, 2651-63.
- Prasanth, S. G., Prasanth, K. V. & Stillman, B. (2002). Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. *Science* 297, 1026-31.

- Prelich, G., Tan, C. K., Kostura, M., Mathews, M. B., So, A. G., Downey, K. M. & Stillman, B.** (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature* 326, 517-20.
- Prosperi, E., Stivala, L. A., Sala, E., Scovassi, A. I. & Bianchi, L.** (1993). Proliferating cell nuclear antigen complex formation induced by ultraviolet irradiation in human quiescent fibroblasts as detected by immunostaining and flow cytometry. *Exp Cell Res* 205, 320-5.
- Quintana, D. G., Thome, K. C., Hou, Z. H., Ligon, A. H., Morton, C. C. & Dutta, A.** (1998). ORC5L, a new member of the human origin recognition complex, is deleted in uterine leiomyomas and malignant myeloid diseases. *J Biol Chem* 273, 27137-45.
- Raff, M. C.** (1996). Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell* 86, 173-5.
- Raghuraman, M. K., Winzler, E. A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D. J., Davis, R. W., Brewer, B. J. & Fangman, W. L.** (2001). Replication dynamics of the yeast genome. *Science* 294, 115-21.
- Ramachandran, N., Hainsworth, E., Bhullar, B., Eisenstein, S., Rosen, B., Lau, A. Y., Walter, J. C. & LaBaer, J.** (2004). Self-assembling protein microarrays. *Science* 305, 86-90.
- Ramnath, N., Hernandez, F. J., Tan, D. F., Huberman, J. A., Natarajan, N., Beck, A. F., Hyland, A., Todorov, I. T., Brooks, J. S. & Bepler, G.** (2001). MCM2 is an independent predictor of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 19, 4259-66.
- Randell, J. C., Bowers, J. L., Rodriguez, H. K. & Bell, S. P.** (2006). Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol Cell* 21, 29-39.
- Rattner, J. B., Rao, A., Fritzler, M. J., Valencia, D. W. & Yen, T. J.** (1993). CENP-F is a ca 400 kDa kinetochore protein that exhibits a cell-cycle dependent localization. *Cell Motil Cytoskeleton* 26, 214-26.
- Rayman, J. B., Takahashi, Y., Indjeian, V. B., Dannenberg, J. H., Catchpole, S., Watson, R. J., te Riele, H. & Dynlacht, B. D.** (2002). E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* 16, 933-47.
- Reardon, J. T. & Sancar, A.** (2002). Molecular anatomy of the human excision nuclease assembled at sites of DNA damage. *Mol Cell Biol* 22, 5938-45.
- Rechsteiner, M. & Rogers, S. W.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21, 267-71.
- Reed, S. I.** (1997). Control of the G1/S transition. *Cancer Surv* 29, 7-23.
- Reeves, E. P., Dekker, L. V., Forbes, L. V., Wientjes, F. B., Grogan, A., Pappin, D. J. & Segal, A. W.** (1999). Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils. *Biochem J* 344 Pt 3, 859-66.
- Rehman, M. A., Fourel, G., Mathews, A., Ramdin, D., Espinosa, M., Gilson, E. & Yankulov, K.** (2006). Differential requirement of DNA replication factors for subtelomeric ARS consensus sequence protosilencers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174, 1801-10.
- Ren, B., Yu, G., Tseng, G. C., Cieply, K., Gavel, T., Nelson, J., Michalopoulos, G., Yu, Y. P. & Luo, J. H.** (2006). MCM7 amplification and overexpression are associated with prostate cancer progression. *Oncogene* 25, 1090-8.
- Ren, S. & Rollins, B. J.** (2004). Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* 117, 239-51.
- Rheaume, E., Cohen, L. Y., Uhlmann, F., Lazure, C., Alam, A., Hurwitz, J., Sekaly, R. P. & Denis, F.** (1997). The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis. *Embo J* 16, 6346-54.
- Rhodes, D. R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A. & Chinnaiyan, A. M.** (2004). Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9309-14.
- Ricke, R. M. & Bielinsky, A. K.** (2004). Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase- α . *Mol Cell* 16, 173-85.
- Riddle, V. G., Pardee, A. B. & Rossow, P. W.** (1979). Growth control of normal and transformed cells. *J Supramol Struct* 11, 529-38.
- Riedl, T., Hanaoka, F. & Egly, J. M.** (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *Embo J* 22, 5293-303.
- Ritzi, M., Baack, M., Musahl, C., Romanowski, P., Laskey, R. A. & Knippers, R.** (1998). Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin. *J Biol Chem* 273, 24543-9.
- Rivard, N., L'Allemain, G., Bartek, J. & Pouyssegur, J.** (1996). Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J Biol Chem* 271, 18337-41.
- Robbins, E., Levine, E. M. & Eagle, H.** (1970). Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells. *J Exp Med* 131, 1211-22.
- Robertson, J. D., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B.** (2000). Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol* 129, 346-58.
- Rodins, K., Cheale, M., Coleman, N. & Fox, S. B.** (2002). Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility. *Clin Cancer Res* 8, 1075-81.
- Rogers, S., Wells, R. & Rechsteiner, M.** (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-8.
- Roninson, I. B., Broude, E. V. & Chang, B. D.** (2001). If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 4, 303-13.
- Rose, D. S., Maddox, P. H. & Brown, D. C.** (1994). Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin Pathol* 47, 1010-4.
- Rotrosen, D. & Gallin, J. I.** (1987). Disorders of phagocyte function. *Annu Rev Immunol* 5, 127-50.
- Roukos, V., Iliou, M. S., Nishitani, H., Gentzel, M., Wilm, M., Taraviras, S. & Lygerou, Z.** (2007). Geminin cleavage during apoptosis by caspase-3 alters its binding ability to the SWI/SNF subunit Brahma. *J Biol Chem*.
- Rovera, G., Santoli, D. & Damsky, C.** (1979). Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2779-83.
- Rowland, B. D. & Bernards, R.** (2006). Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs. *Cell* 127, 871-4.
- Rowley, A., Cocker, J. H., Harwood, J. & Diffley, J. F.** (1995). Initiation complex assembly at budding yeast replication origins begins with the recognition of a bipartite sequence by limiting amounts of the initiator, ORC. *Embo J* 14, 2631-41.

- Russell, A., Thompson, M. A., Hendley, J., Trute, L., Armes, J. & Germain, D. (1999). Cyclin D1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer. *Oncogene* 18, 1983-91.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J. & Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-31.
- Sage, J. (2004). Cyclin C makes an entry into the cell cycle. *Dev Cell* 6, 607-8.
- Saha, P., Chen, J., Thome, K. C., Lawlis, S. J., Hou, Z. H., Hendricks, M., Parvin, J. D. & Dutta, A. (1998a). Human CDC6/Cdc18 associates with Orc1 and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of S phase. *Mol Cell Biol* 18, 2758-67.
- Saha, P., Thome, K. C., Yamaguchi, R., Hou, Z., Weremowicz, S. & Dutta, A. (1998b). The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* CDC45. *J Biol Chem* 273, 18205-9.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K. & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73, 39-85.
- Sangrithi, M. N., Bernal, J. A., Madine, M., Philpott, A., Lee, J., Dunphy, W. G. & Venkitaraman, A. R. (2005). Initiation of DNA replication requires the RECQL4 protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *Cell* 121, 887-98.
- Sato, N., Arai, K. & Masai, H. (1997). Human and *Xenopus* cDNAs encoding budding yeast Cdc7-related kinases: in vitro phosphorylation of MCM subunits by a putative human homologue of Cdc7. *Embo J* 16, 4340-51.
- Sawyer, S. L., Cheng, I. H., Chai, W. & Tye, B. K. (2004). Mcm10 and Cdc45 cooperate in origin activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 340, 195-202.
- Scholzen, T. & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311-22.
- Schories, B., Engel, K., Dorken, B., Gossen, M. & Bommert, K. (2004). Characterization of apoptosis-induced Mcm3 and Cdc6 cleavage reveals a proapoptotic effect for one Mcm3 fragment. *Cell Death Differ* 11, 940-2.
- Schulte, D., Richter, A., Burkhart, R., Musahl, C. & Knippers, R. (1996). Properties of the human nuclear protein p85Mcm. Expression, nuclear localization and interaction with other Mcm proteins. *Eur J Biochem* 235, 144-51.
- Schwab, B. L., Leist, M., Knippers, R. & Nicotera, P. (1998). Selective proteolysis of the nuclear replication factor MCM3 in apoptosis. *Exp Cell Res* 238, 415-21.
- Scott, I. S., Morris, L. S., Bird, K., Davies, R. J., Vowler, S. L., Rushbrook, S. M., Marshall, A. E., Laskey, R. A., Miller, R., Arends, M. J. et al. (2003). A novel immunohistochemical method to estimate cell-cycle phase distribution in archival tissue: implications for the prediction of outcome in colorectal cancer. *J Pathol* 201, 187-97.
- Sears, R., Ohtani, K. & Nevins, J. R. (1997). Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals. *Mol Cell Biol* 17, 5227-35.
- Semple, J. W. & Duncker, B. P. (2004). ORC-associated replication factors as biomarkers for cancer. *Biotechnol Adv* 22, 621-31.
- Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-7.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Setkov, N. A., Kazakov, V. N., Rosenwald, I. B., Makarova, G. F. & Epifanova, O. I. (1992). Protein synthesis inhibitors, like growth factors, may render resting 3T3 cells competent for DNA synthesis: a radioautographic and cell fusion study. *Cell Prolif* 25, 181-91.
- Shah, G. M., Kaufmann, S. H. & Poirier, G. G. (1995). Detection of poly(ADP-ribose) polymerase and its apoptosis-specific fragment by a nonisotopic activity-western blot technique. *Anal Biochem* 232, 251-4.
- Shaikh, T. H., Gottlieb, S., Sellinger, B., Chen, F., Roe, B. A., Oakey, R. J., Emanuel, B. S. & Budarf, M. L. (1999). Characterization of CDC45L: a gene in the 22q11.2 deletion region expressed during murine and human development. *Mamm Genome* 10, 322-6.
- Shechter, D., Costanzo, V. & Gautier, J. (2004). Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)* 3, 901-8.
- Shechter, D. & Gautier, J. (2004). MCM proteins and checkpoint kinases get together at the fork. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10845-6.
- Shechter, D. & Gautier, J. (2005). ATM and ATR check in on origins: a dynamic model for origin selection and activation. *Cell Cycle* 4, 235-8.
- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-65.
- Sherr, C. J. (1994a). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-5.
- Sherr, C. J. (1994b). Growth factor-regulated G1 cyclins. *Stem Cells* 12 Suppl 1, 47-55; discussion 55-7.
- Sherr, C. J. (1995). D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* 20, 187-90.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-7.
- Sherr, C. J. & Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149-63.
- Sherwood, S. W., Rush, D., Ellsworth, J. L. & Schimke, R. T. (1988). Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9086-90.
- Shimada, K. & Gasser, S. M. (2007). The origin recognition complex functions in sister-chromatid cohesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 128, 85-99.
- Shivji, K. K., Kenny, M. K. & Wood, R. D. (1992). Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69, 367-74.
- Shreeram, S. & Blow, J. J. (2003). The role of the replication licensing system in cell proliferation and cancer. *Prog Cell Cycle Res* 5, 287-93.
- Slansky, J. E., Li, Y., Kaelin, W. G. & Farnham, P. J. (1993). A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol* 13, 1610-8.
- Smith, E. J., Leone, G., DeGregori, J., Jakoi, L. & Nevins, J. R. (1996). The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state. *Mol Cell Biol* 16, 6965-76.
- Sotiriou, C., Neo, S. Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S. B., Harris, A. L. & Liu, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10393-8.

- Starborg, M., Gell, K., Brundell, E. & Hoog, C.** (1996). The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci* 109 (Pt 1), 143-53.
- Stedman, W., Deng, Z., Lu, F. & Lieberman, P. M.** (2004). ORC, MCM, and histone hyperacetylation at the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent replication origin. *J Virol* 78, 12566-75.
- Stein, G. H., Drullinger, L. F., Soulard, A. & Dulic, V.** (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19, 2109-17.
- Steinman, R. A., Hoffman, B., Iro, A., Guillouf, C., Liebermann, D. A. & el-Houseini, M. E.** (1994). Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 9, 3389-96.
- Stevaux, O. & Dyson, N. J.** (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 14, 684-91.
- Stevens, R., Grelon, M., Vezon, D., Oh, J., Meyer, P., Perennes, C., Domenichini, S. & Bergounioux, C.** (2004). A CDC45 homolog in Arabidopsis is essential for meiosis, as shown by RNA interference-induced gene silencing. *Plant Cell* 16, 99-113.
- Stoeber, K., Mills, A. D., Kubota, Y., Krude, T., Romanowski, P., Marheineke, K., Laskey, R. A. & Williams, G. H.** (1998). Cdc6 protein causes premature entry into S phase in a mammalian cell-free system. *Embo J* 17, 7219-29.
- Stoeber, K., Tlsty, T. D., Happerfield, L., Thomas, G. A., Romanov, S., Bobrow, L., Williams, E. D. & Williams, G. H.** (2001). DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci* 114, 2027-41.
- Stroh, C. & Schulze-Osthoff, K.** (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 5, 997-1000.
- Stuermer, A., Hoehn, K., Faul, T., Auth, T., Brand, N., Kneissl, M., Putter, V. & Grummt, F.** (2007). Mouse pre-replicative complex proteins colocalise and interact with the centrosome. *Eur J Cell Biol* 86, 37-50.
- Sugimoto, N., Tatsumi, Y., Tsurumi, T., Matsukage, A., Kiyono, T., Nishitani, H. & Fujita, M.** (2004). Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding. *J Biol Chem* 279, 19691-7.
- Sun, W. H., Coleman, T. R. & DePamphilis, M. L.** (2002). Cell cycle-dependent regulation of the association between origin recognition proteins and somatic cell chromatin. *Embo J* 21, 1437-46.
- Suter, B., Tong, A., Chang, M., Yu, L., Brown, G. W., Boone, C. & Rine, J.** (2004). The origin recognition complex links replication, sister chromatid cohesion and transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 167, 579-91.
- Suzuki, N., Suzuki, T., Uchida, A., Thompson, E. A. & Hosoya, T.** (1992). Effect of dexamethasone on nucleolar casein kinase II activity and phosphorylation of nucleolin in lymphosarcoma P1798 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42, 305-12.
- Suzuki, S., Adachi, A., Hiraiwa, A., Ohashi, M., Ishibashi, M. & Kiyono, T.** (1998). Cloning and characterization of human MCM7 promoter. *Gene* 216, 85-91.
- Tachibana, K. E., Gonzalez, M. A. & Coleman, N.** (2005). Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *J Pathol* 205, 123-9.
- Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M. & Blow, J. J.** (2001). Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol* 3, 107-13.
- Takahara, K., Bong, M., Brevard, R., Eddy, R. L., Haley, L. L., Sait, S. J., Shows, T. B., Hoffman, G. G. & Greenspan, D. S.** (1996). Mouse and human homologues of the yeast origin of replication recognition complex subunit ORC2 and chromosomal localization of the cognate human gene ORC2L. *Genomics* 31, 119-22.
- Takahashi, Y., Rayman, J. B. & Dynlacht, B. D.** (2000). Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* 14, 804-16.
- Takayama, Y., Kamimura, Y., Okawa, M., Muramatsu, S., Sugino, A. & Araki, H.** (2003). GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Genes Dev* 17, 1153-65.
- Takeda, D. Y. & Dutta, A.** (2005). DNA replication and progression through S phase. *Oncogene* 24, 2827-43.
- Tamrakar, S., Rubin, E. & Ludlow, J. W.** (2000). Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci* 5, D121-37.
- Tan, D. F., Huberman, J. A., Hyland, A., Loewen, G. M., Brooks, J. S., Beck, A. F., Todorov, I. T. & Bepler, G.** (2001). MCM2--a promising marker for premalignant lesions of the lung: a cohort study. *BMC Cancer* 1, 6.
- Tanaka, S. & Diffley, J. F.** (2002). Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat Cell Biol* 4, 198-207.
- Teer, J. M. & Dutta, A.** (2005). Regulation of S Phase. In *Results Probl Cell Differ*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Tercero, J. A., Labib, K. & Diffley, J. F.** (2000). DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p. *Embo J* 19, 2082-93.
- Territo, M. C. & Cline, M. J.** (1977). Monocyte function in man. *J Immunol* 118, 187-92.
- Thalmeier, K., Synovzik, H., Mertz, R., Winnacker, E. L. & Lipp, M.** (1989). Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev* 3, 527-36.
- Thomas, D. B. & Lingwood, C. A.** (1975). A model of cell cycle control: effects of thymidine on synchronous cell cultures. *Cell* 5, 37-42.
- Todorov, I. T., Attaran, A. & Kearsey, S. E.** (1995). BM28, a human member of the MCM2-3-5 family, is displaced from chromatin during DNA replication. *J Cell Biol* 129, 1433-45.
- Todorov, I. T., Werness, B. A., Wang, H. Q., Buddharaju, L. N., Todorova, P. D., Slocum, H. K., Brooks, J. S. & Huberman, J. A.** (1998). HsMCM2/BM28: a novel proliferation marker for human tumors and normal tissues. *Lab Invest* 78, 73-8.
- Toschi, L. & Bravo, R.** (1988). Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 107, 1623-8.
- Toueilie, M. & Hubscher, U.** (2004). Regulation of the DNA replication fork: a way to fight genomic instability. *Chromosoma* 113, 113-25.
- Toyoshima, H. & Hunter, T.** (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.
- Trimarchi, J. M., Fairchild, B., Wen, J. & Lees, J. A.** (2001). The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1519-24.

- Trimarchi, J. M. & Lees, J. A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 11-20.
- Tsao, C. C., Geisen, C. & Abraham, R. T. (2004). Interaction between human MCM7 and Rad17 proteins is required for replication checkpoint signaling. *Embo J* 23, 4660-9.
- Tsujimoto, Y. (1997). Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ* 4, 429-34.
- Tsuruga, H., Yabuta, N., Hashizume, K., Ikeda, M., Endo, Y. & Nojima, H. (1997). Expression, nuclear localization and interactions of human MCM/P1 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 118-25.
- Tuusa, J., Uitto, L. & Syvaöja, J. E. (1995). Human DNA polymerase epsilon is expressed during cell proliferation in a manner characteristic of replicative DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 23, 2178-83.
- Tye, B. K. (1999). MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem* 68, 649-86.
- Tyers, M. & Jorgensen, P. (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev* 10, 54-64.
- Ubeda, M. & Habener, J. F. (1997). The large subunit of the DNA replication complex C (DSEB/RF-C140) cleaved and inactivated by caspase-3 (CPP32/YAMA) during Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 19562-8.
- Uchiyama, M., Arai, K. & Masai, H. (2001a). Sna41goa1, a novel mutation causing G1/S arrest in fission yeast, is defective in a CDC45 homolog and interacts genetically with polalpha. *Mol Genet Genomics* 265, 1039-49.
- Uchiyama, M., Griffiths, D., Arai, K. & Masai, H. (2001b). Essential role of Sna41/Cdc45 in loading of DNA polymerase alpha onto minichromosome maintenance proteins in fission yeast. *J Biol Chem* 276, 26189-96.
- Umezawa, H. (1976). Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. *Methods Enzymol* 45, 678-95.
- van der Kuip, H., Carius, B., Haque, S. J., Williams, B. R., Huber, C. & Fischer, T. (1999). The DNA-binding subunit p140 of replication factor C is upregulated in cycling cells and associates with G1 phase cell cycle regulatory proteins. *J Mol Med* 77, 386-92.
- van Dierendonck, J. H., Wijsman, J. H., Keijzer, R., van de Velde, C. J. & Cornelisse, C. J. (1991). Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdUrd labeling and Ki-67 staining. *Am J Pathol* 138, 1165-72.
- van Diest, P. J., Brugal, G. & Baak, J. P. (1998). Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 51, 716-24.
- Van Hatten, R. A., Tutter, A. V., Holway, A. H., Khederian, A. M., Walter, J. C. & Michael, W. M. (2002). The Xenopus Xmus101 protein is required for the recruitment of Cdc45 to origins of DNA replication. *J Cell Biol* 159, 541-7.
- van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T. et al. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-6.
- Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S. & Trouche, D. (2001). Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol Cell Biol* 21, 6484-94.
- Varshavsky, A. (1992). The N-end rule. *Cell* 69, 725-35.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12142-9.
- Varshavsky, A. (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* 2, 13-28.
- Vaziri, C., Saxena, S., Jeon, Y., Lee, C., Murata, K., Machida, Y., Wagle, N., Hwang, D. S. & Dutta, A. (2003). A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication. *Mol Cell* 11, 997-1008.
- Verheijen, R., Kuijpers, H. J., van Driel, R., Beck, J. L., van Dierendonck, J. H., Brakenhoff, G. J. & Ramaekers, F. C. (1989). Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 92 (Pt 4), 531-40.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36, 131-49.
- Vlach, J., Hennecke, S. & Amati, B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* 16, 5334-44.
- Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B. J. & Grunstein, M. (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol Cell* 10, 1223-33.
- Waga, S. & Stillman, B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 67, 721-51.
- Walter, J. & Newport, J. W. (1997). Regulation of replicon size in Xenopus egg extracts. *Science* 275, 993-5.
- Walter, J. C. (2000). Evidence for sequential action of cdc7 and cdk2 protein kinases during initiation of DNA replication in Xenopus egg extracts. *J Biol Chem* 275, 39773-8.
- Wang, X., Ira, G., Tercero, J. A., Holmes, A. M., Diffley, J. F. & Haber, J. E. (2004). Role of DNA replication proteins in double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 24, 6891-9.
- Waterhouse, N. J., Ricci, J. E. & Green, D. R. (2002). And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie* 84, 113-21.
- Weinreich, M. & Stillman, B. (1999). Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway. *Embo J* 18, 5334-46.
- Welcker, M., Lukas, J., Strauss, M. & Bartek, J. (1996). Enhanced protein stability: a novel mechanism of D-type cyclin over-abundance identified in human sarcoma cells. *Oncogene* 13, 419-25.
- Wells, J., Boyd, K. E., Fry, C. J., Bartley, S. M. & Farnham, P. J. (2000). Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells. *Mol Cell Biol* 20, 5797-807.
- Whalen, A. M., Galasinski, S. C., Shapiro, P. S., Nahreini, T. S. & Ahn, N. G. (1997). Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol* 17, 1947-58.
- Wharton, S. B., Chan, K. K., Anderson, J. R., Stoeber, K. & Williams, G. H. (2001). Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27, 305-13.
- Wilkinson, E. J. & Hendricks, J. B. (1995). Role of the pathologist in biomarker studies. *J Cell Biochem Suppl* 23, 10-8.
- Williams, G. H., Romanowski, P., Morris, L., Madine, M., Mills, A. D., Stoeber, K., Marr, J., Laskey, R. A. & Coleman, N. (1998). Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14932-7.
- Williams, R. S., Shohet, R. V. & Stillman, B. (1997). A human protein related to yeast Cdc6p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 142-7.

- Winter, D. B., Phung, Q. H., Wood, R. D. & Gearhart, P. J. (2000). Differential expression of DNA polymerase epsilon in resting and activated B lymphocytes is consistent with an in vivo role in replication and not repair. *Mol Immunol* 37, 125-31.
- Wohlschlegel, J. A., Dhar, S. K., Prokhorova, T. A., Dutta, A. & Walter, J. C. (2002). Xenopus Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45. *Mol Cell* 9, 233-40.
- Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Dhar, S. K., Cvetič, C., Walter, J. C. & Dutta, A. (2000). Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science* 290, 2309-12.
- Wolf, D. A., McKeon, F. & Jackson, P. K. (1999). Budding yeast Cdc6p induces re-replication in fission yeast by inhibition of SCF(Pop)-mediated proteolysis. *Mol Gen Genet* 262, 473-80.
- Wollmann, Y. (2005). Das Miz1-interagierende Protein TopBP1: Identifizierung neuer Interaktionspartner und Untersuchungen zur Rolle bei der Zellzyklusregulation: Universität Jena, Dissertation.
- Won, K. A. & Reed, S. I. (1996). Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Embo J* 15, 4182-93.
- Won, K. A., Xiong, Y., Beach, D. & Gilman, M. Z. (1992). Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9910-4.
- Wong, H. & Riabowol, K. (1996). Differential CDK-inhibitor gene expression in aging human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol* 31, 311-25.
- Woo, R. A. & Poon, R. Y. (2003). Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2, 316-24.
- Woodward, A. M., Gohler, T., Luciani, M. G., Oehlmann, M., Ge, X., Gartner, A., Jackson, D. A. & Blow, J. J. (2006). Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J Cell Biol* 173, 673-83.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Wyrick, J. J., Aparicio, J. G., Chen, T., Barnett, J. D., Jennings, E. G., Young, R. A., Bell, S. P. & Aparicio, O. M. (2001). Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science* 294, 2357-60.
- Xeros, N. (1962). Deoxyriboside control and synchronization of mitosis. *Nature* 194, 682-3.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. & Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-4.
- Xouri, G., Lygerou, Z., Nishitani, H., Pachnis, V., Nurse, P. & Taraviras, S. (2004). Cdt1 and geminin are down-regulated upon cell cycle exit and are over-expressed in cancer-derived cell lines. *Eur J Biochem* 271, 3368-78.
- Yabuuchi, H., Yamada, Y., Uchida, T., Sunathvanichkul, T., Nakagawa, T. & Masukata, H. (2006). Ordered assembly of Sld3, GINS and Cdc45 is distinctly regulated by DDK and CDK for activation of replication origins. *Embo J* 25, 4663-74.
- Yamada, Y., Nakagawa, T. & Masukata, H. (2004). A novel intermediate in initiation complex assembly for fission yeast DNA replication. *Mol Biol Cell* 15, 3740-50.
- Yan, Z., DeGregori, J., Shohet, R., Leone, G., Stillman, B., Nevins, J. R. & Williams, R. S. (1998). Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3603-8.
- Yim, H., Hwang, I. S., Choi, J. S., Chun, K. H., Jin, Y. H., Ham, Y. M., Lee, K. Y. & Lee, S. K. (2006). Cleavage of Cdc6 by caspase-3 promotes ATM/ATR kinase-mediated apoptosis of HeLa cells. *J Cell Biol* 174, 77-88.
- Yim, H., Jin, Y. H., Park, B. D., Choi, H. J. & Lee, S. K. (2003). Caspase-3-mediated cleavage of Cdc6 induces nuclear localization of p49-truncated Cdc6 and apoptosis. *Mol Biol Cell* 14, 4250-9.
- Yoon, H. J., Loo, S. & Campbell, J. L. (1993). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* CDC7 function during the cell cycle. *Mol Biol Cell* 4, 195-208.
- Yoshida, K. & Inoue, I. (2003). Conditional expression of MCM7 increases tumor growth without altering DNA replication activity. *FEBS Lett* 553, 213-7.
- Yoshida, K. & Inoue, I. (2004a). Expression of MCM10 and TopBP1 is regulated by cell proliferation and UV irradiation via the E2F transcription factor. *Oncogene* 23, 6250-60.
- Yoshida, K. & Inoue, I. (2004b). Regulation of Geminin and Cdt1 expression by E2F transcription factors. *Oncogene* 23, 3802-12.
- Yoshida, K., Kuo, F., George, E. L., Sharpe, A. H. & Dutta, A. (2001). Requirement of CDC45 for postimplantation mouse development. *Mol Cell Biol* 21, 4598-603.
- Yusuf, I. & Fruman, D. A. (2003). Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends Immunol* 24, 380-6.
- Zamai, L., Falcieri, E., Zauli, G., Cataldi, A. & Vitale, M. (1993). Optimal detection of apoptosis by flow cytometry depends on cell morphology. *Cytometry* 14, 891-7.
- Zetterberg, A., Larsson, O. & Wiman, K. G. (1995). What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 7, 835-42.
- Zhang, J. H. & Xu, M. (2000). DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* 10, 205-11.
- Zhang, R., Chen, W. & Adams, P. D. (2007). Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* 27, 2343-58.
- Zhang, R., Poustovoitov, M. V., Ye, X., Santos, H. A., Chen, W., Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Serebriiskii, I. G., Canutescu, A. A., Dunbrack, R. L. et al. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8, 19-30.
- Zhang, W., Grasso, L., McClain, C. D., Gambel, A. M., Cha, Y., Travali, S., Deisseroth, A. B. & Mercer, W. E. (1995). p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. *Cancer Res* 55, 668-74.
- Zhong, W., Feng, H., Santiago, F. E. & Kipreos, E. T. (2003). CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA-replication licensing. *Nature* 423, 885-9.
- Zhou, J., Wang, Z., Sun, S., Liu, M. & Zhang, H. (2001). A rapid method for detecting conformational changes during differentiation and apoptosis of HL60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biotechnol Appl Biochem* 33, 127-32.
- Zhou, P. (2004). Determining protein half-lives. *Methods Mol Biol* 284, 67-77.
- Zhou, P., Yao, Y., Soh, J. W. & Weinstein, I. B. (1999). Overexpression of p21Cip1 or p27Kip1 in the promyelocytic leukemia cell line HL60 accelerates its lineage-specific differentiation. *Anticancer Res* 19, 4935-45.
- Zimmermann, A. (2002). Liver regeneration: the emergence of new pathways. *Med Sci Monit* 8, RA53-63.

- Zlotkin, T., Kaufmann, G., Jiang, Y., Lee, M. Y., Uitto, L., Syvaaja, J., Dornreiter, I., Fanning, E. & Nethanel, T.** (1996). DNA polymerase epsilon may be dispensable for SV40- but not cellular-DNA replication. *Embo J* 15, 2298-305.
- Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T. & Kirschner, M. W.** (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* 285, 418-22.
- Zou, L., Mitchell, J. & Stillman, B.** (1997). CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication. *Mol Cell Biol* 17, 553-63.
- Zou, L. & Stillman, B.** (1998). Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science* 280, 593-6.
- Zou, L. & Stillman, B.** (2000). Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol* 20, 3086-96.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Ampere
ADP	Adenosindiphosphat
AI	Apoptose-Induktion
Ak	Antikörper
AP	<i>alkaline phosphatase</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM related</i>
bp	<i>base pair(s)</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BrdU	5-Brom-2'-desoxy-Uridin
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
Cdc	<i>cell division cycle</i>
Cdk	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	<i>copy</i> oder <i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
Cdt1	<i>Cdc10 target 1</i>
CENP-F	<i>centromer protein F</i>
CHX	Cycloheximid
CIP	<i>cdk inhibitory protein</i>
Cy2	Cyanin 2 (Carbocyanin)
Cy3	Cyanin 3 (Indocarbocyanin)
Da	Dalton
DABCO	[1,4-Diaza-bicyclo [2.2.2]octan]
DAPI	4',6-Diamin-2-phenylindol
Dbf4	<i>dumb-bell former 4</i>
D-Box	<i>destruction-Box</i>
DDK	<i>Dbf4 dependent kinase</i>
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
Dpb11	<i>DNA polymerase B possible subunit 11</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (981 cm s ⁻²)
G ₀ , G ₁ , G ₂	<i>gap</i>
GIN5	<i>go ichi ni san</i>
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IB	Immunblot
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IP	Immunpräzipitation
KCl	Kaliumchlorid
Ki-67	Kiel 67
KIP	<i>kinase inhibiting protein</i>
l	Liter
log	logarithmisch
M	Mitose oder Molar (mol/l)
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
Mcm	<i>minichromosome maintenance</i>
MIB-1	<i>Molecular Immunology Borstel-1</i>
min	Minute(n)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
Mus101	<i>nitrogen mustard-sensitive 101</i>
Myc	<i>myelocytomatosis</i>

NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazolium
NER	nucleotide excision repair
ori	origin of replication
ORC	origin recognition complex
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP1	Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PGS	Protein-G-Sepharose
pH	pH-Wert
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	protein of retinoblastoma gene
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rad4	radiation-sensitive 4
RF-C	replication factor C
RING	really interesting new gene
RNAi	RNA interference
ROS	reactive oxygen species
RPA	replication protein A
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S	Synthese
SDS	sodium dodecyl sulphate
Sld	synthetically lethal with dpb11
T _{1/2}	Halbwertszeit
TBS(T)	Tris buffered saline (Tween® 20)
TdR	Thymin-desoxy-Ribose
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TopBP1	topoisomerase binding protein 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit
UV	ultraviolette Strahlung
v/v	Volumenprozent
V	Volt
w/v	Gewichtsprozent

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

Jena, den 16.04.2007

Lebenslauf

Name	Sibyll Pollok
geboren am	06.05.1976 in Weimar/Thüringen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Hochschulausbildung

seit 12/2002	Promotion am Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz-Lipmann-Institut e.V., in der Arbeitsgruppe Biochemie
09/1997-10/2002	Studium der Biochemie an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena

Berufsausbildung

08/1994-07/1997	Ausbildung zur Industriekauffrau in der Hörmann FUNKWERK GmbH in Kölleda
-----------------	--

Schulausbildung

06/1994	Abitur am Staatlichen Gymnasium „Prof. F. Hofmann“ in Kölleda
---------	---

Publikationen

S. Pollok, C. Bauerschmidt, J. Sängler, H.-P. Nasheuer & F. Grosse

„Human Cdc45 is a proliferation-associated antigen“

Manuskript eingereicht

C. Bauerschmidt, **S. Pollok**, E. Kremmer, H.-P. Nasheuer & F. Grosse

„Interaction of human Cdc45 with the Mcm2-7 complex, the GINS complex and DNA polymerases δ and ϵ during S phase“

Genes to Cells, 2007, issue 6 of volume 12, in press

S. Pollok, J. Stoepel, C. Bauerschmidt, E. Kremmer & H.-P. Nasheuer

„Regulation of eukaryotic DNA replication at the initiation step“

Biochemical Society Transactions 2003, volume 31, part 1: 266-269

PMID: 12546699

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Biochemie am Fritz-Lipmann-Institut in Jena angefertigt. Ich bedanke mich bei **Prof. Frank Große** und **PD Dr. Heinz-Peter Nasheuer** für die Überlassung des hochinteressanten Forschungsthemas und die Möglichkeit, dieses Projekt eigenständig zu planen und experimentell umzusetzen.

Dr. Jörg Sänger von der Pathologie in Bad Berka danke sehr ich für seine Bemühungen in der immunhistochemischen Cdc45-Detektion.

Annerose Schneider danke ich herzlich für ihre Unterstützung bei den radioaktiven Experimenten. Wir waren einige Jahre *cage mates* im Labor 111 und ich habe mich hier immer *fast wie zu Hause* gefühlt. Auch ließ sie geduldig meine *gelegentlichen Ausführungen* zum Thema „Schädlichkeit des Zigarettenkonsums“ über sich ergehen und schenkte mir auch dann noch ein freundliches Lächeln, nachdem ich ihr zum hundertsten Mal sagte: „Du hast geraucht!“.

Für die kurzweiligen, regenerativen *Minuten* an Labor-, Schreib- und Mensatisch bedanke ich mich bei **Kristin Dreffke**. Einige spektakuläre Aktionen im Labor werden mir immer in Erinnerung bleiben: die Fönaktion der Membranen; das Pipettieren einer sonderbaren viskösen Substanz, bei der es sich möglicherweise um DNA handelte und nicht zu vergessen die polynesischen Volksmusik. Ich bin dankbar dafür, dich kennen gelernt zu haben und hoffe, dass wir auch weiterhin in Kontakt bleiben.

ChrisTINA Bauerschmidt okkupierte mit mir einige Jahre die Cdc45-Nische und wir kämpften gemeinsam tapfer und ausdauernd für unsere Existenzberechtigung als *letzte Replizierer* in der lokal von p53 und TopoI dominierten Wissenschaft. Lieben Dank für das offene Ohr und den Zuspruch in schweren Zeiten, aber auch für jede Menge Spaß und Lachen in vielen guten Zeiten. Nicht unerwähnt bleiben sollte die Tatsache, dass nur durch unsere Treue diverse Süßwarenhersteller ihre Umsätze steigern konnten. Ich denke, wir schaffen es auch weiterhin, die regelmäßige zwischenmenschliche Kommunikation („Es lebe die Skypofonie!“) aufrecht zu erhalten und uns auch gelegentlich mal wieder gegenüber zu stehen, um das Vorhandensein des „Lächelns in den Augen“ zu überprüfen.

Meiner lieben Studienfreundin **Anja Rockstroh** bin ich auf vielfältige Weise zu Dank verpflichtet. Es gibt nur wenige Menschen, denen man zufällig begegnet und ohne Bedenken Einblick und Eintritt in sein Leben gewähren kann, weil man sich hundertprozentig sicher ist, dass derjenige *alles* versteht. Vielen, vielen Dank für das Interesse am wissenschaftlichen und persönlichen Leben, die unzähligen schönen außeruniversitären Unternehmungen, die stete Bereitschaft zur Problemlösung, die motivierenden Worte und die Ausstrahlung einer beneidenswerten Gelassenheit als *stress response*.

Anja, mit niemandem war das Jammern so schön wie mit dir.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an alle **Mitarbeiter der Biochemie** für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Weiterhin danke ich von ganzem Herzen **Peter, Tobias, Therese, Marcel, Norma, Betty, Anke, Ralf, Micha, Josi, Jana** und **Laura** für die schöne Zeit.

Meiner Mutti **Karin Pollok** möchte ich liebevoll dafür danken, dass sie mir mein Studium und meine Promotion ermöglicht, meinen Lebensentscheidungen vertraut und mir Kraft und Mut für neue Anfänge gegeben hat.

Für jeden der lacht, gibt es einen der weint.

All´ denen, die leider viel zu früh *gegangen* sind und mein Leben nun von einer *höheren Ebene* aus verfolgen, möchte ich voller Stolz zurufen: „Ich habe es geschafft!“.

Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem Schlusspunkt,
sondern mit einem Fragezeichen.

Hermann Hesse